В. А. ДЕВЯТНИН

МЕТОДЫ ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА в ПРОИЗВОДСТВЕ ВИТАМИНОВ

МЕДИЦИНА 1964

В. А. ДЕВЯТНИН

Методы химического анализа в производстве витаминов

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МЕДИЦИНА»
Москва — 1964

АННОТАЦИЯ

В книге собраны разрабатывавшиеся в течение 15 лет в лаборатории автором совместно с работниками производств, а также уже принятые в практике методы анализов полупродуктов и готового продукта в синтезе и производстве витаминов Описано около 300 методов анализа по всем стадиям производства витаминов А, B_1, B_2, B_3 (пантотеновая кислота), B_6, B_{12}, B_c (фолиевая кислота), С, Р, РР, Е, D, К и каротина В книге также приведены новейшие методы определения витаминов не только в препаратах, но и в естественных продуктах, что представляется важным для лабораторий, занятых вопросами изучения сырья и витаминного состава пищевых продуктов

Книга рассчитана на работников лабораторий витаминных и фармацевтических предприятий, аптечных работников, химиков-аналитиков, сотрудников контрольно аналитических лабораторий, санитарно эпидемиологических станций и др

ДЕВЯТНИН ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ

Методы химического анализа в производстве витаминов

Редактор *Г А Резвецова*

Техн редактор *Н А Буковская* Корректор *Л Ф Карасева*

Переплет художника *Л С Эрмана*

Сдано в набор 11/XI 1963 г Подписано к печати 5/V 1964 г Формат бумаги 84×108[1]/32=11,25 печ л (условных 18,45 л) 16,38 уч изд л

Тираж 2300 экз Т 06369 МН 79

Издательство «Медицина» Москва, Петроверигский пер, 6/8

Заказ 439 11-я типография Главполиграфпрома Государственного комитета Совета Министров СССР по печати, Москва, Нагатинское шоссе, д 1

Цена 1 р 02 к



За последние годы в нашей стране достигнут значительный прогресс в производстве витаминов. Разработаны способы синтеза ряда витаминов, налаживается их получение в укрупненном масштабе Задачи, стоящие перед советскими витаминологами, огромны В ближайшие годы должен быть освоен выпуск почти всех известных витаминов в целях обеспечения потребности в них населения СССР Наибольшее количество витаминов будет использоваться для витаминизации пищевых продуктов. Немалый удельный вес имеют также использование витаминов с лечебными целями и применение их в животноводстве.

В связи с этим перед большой армией инженеров и техников, работников витаминных и фармацевтических заводов и перед научными учреждениями стоят задачи по овладению контролем производства витаминных препаратов.

Производство витаминов является чрезвычайно сложной отраслью промышленности, поскольку оно основано на тонком химическом синтезе, включающем, как правило, много промежуточных стадий и большое число разнообразных продуктов. Наряду с этим получение витаминов из естественного сырья также предусматри-

вает специальные технологические приемы, поскольку речь касается выделения в чистом виде или в виде концентратов весьма лабильных веществ, каковыми являются, как правило, витамины.

В связи с этим необходим обязательный контроль технологического процесса на разных стадиях и определение качества готового продукта.

Во всех отраслях промышленности существуют методические пособия по контролю производства и лишь производство витаминов не имеет такого пособия. Это объясняется чрезвычайной трудностью разработки методов контроля в производстве витаминов, поскольку число продуктов, подлежащих контролю, чрезвычайно велико, а сами продукты в ряде случаев мало описаны или совсем неизвестны в литературе.

Следует также отметить, что в результате исследовательских работ, осуществляемых во Всесоюзном научно-исследовательском витаминном институте (ВНИВИ) и в других научных учреждениях, а также в научно-исследовательских лабораториях на витаминных заводах, вырабатывается и уточняется технология производства, нередко меняющая всю схему получения препарата. Естественно, в связи с этим изменяются и методы анализа, а кроме того, и сама аналитическая техника в результате использования современных методов физического и физико-химического анализа также в значительной мере изменяется. Тем больше возникает трудностей перед автором, который попытался бы составить соответствующее пособие по методам анализа в производстве витаминов.

Однако и при этих обстоятельствах нужда в таком лабораторном пособии несомненна. Разумеется, те методы, которые можно было бы собрать и описать, целиком не восполнят имеющегося пробела и лишь в какой-то степени смогут оказать помощь лабораторным работникам и аналитикам смежных областей производства.

Состояние вопроса получения витаминов в настоящее время очень коротко можно охарактеризовать следующим образом.

Из естественного сырья на витаминных заводах получают каротин, витамин A, витамин D, витамин C (в виде концентратов и препаратов), витамин P (катехины, рутин), комплексные препараты витаминов C и P, витамин E (в виде концентратов), витамин B_{12} (как продукт биосинтеза).

Путем химического синтеза получают витамин A — ацетат, витамин B_1, B_2, PP, B_6, фолиевую, пантотеновую и пара-аминобензойную кислоты, витамин C и фосфорные эфиры витаминов (кокарбоксилазу, тиамин-монофосфат) и др.

По мере того как разрабатывались технологические процессы производства каждого из этих витаминов, разрабатывались и методы контроля этих процессов. Эта сложная и большая работа проводилась на протяжении ряда лет в химико-аналитической лаборатории и в синтетических лабораториях Всесоюзного научно-исследовательского витаминного института, в его Ленинградском филиале, а также на заводах витаминной промышленности, как, например, на 1-м Ленинградском, Экспериментальном, 2-м Ленинградском, Щелковском, 1-м Московском и других заводах. Эта работа, как правило, проводилась в тесном содружестве института с заводами.

Ряд методов, принятых в настоящее время в контроле производства витаминов, заимствован из смежных отраслей, некоторые из них разрабатывались в других научно-исследовательских учреждениях и были приспособлены с теми или иными изменениями к контролю витаминного производства. Однако и эти методы подвергались соответствующей проверке и апробации во ВНИВИ, прежде чем были использованы для этих целей.

Уместно отметить большие заслуги в части разработки методов контроля полупродуктов и готовой продукции в производстве витаминов инженеров и техников витаминного производства (Е. В. Агапова, Н. Я. Волкова, Б. И. Идельсон, А. Д. Лебедев, Е. А. Обольникова, К. И. Пальмова, Т. Г. Перлова, А. Д. Поспеев, А. Р. Татьянин, М. И. Русакова и др.), так и сотрудников ВНИВИ (В. М. Березовский, Е. В. Богданова, В. А. Вадова, М. Я. Мойжес, Е. И. Гершкович, В. В. Зворыкина, В. М. Иосикова, В. И. Колтунова, Л. Н. Кравчина, М. А. Миропольская, В. М. Ракова, В. В. Никифорова, Л. А. Петрова, Е. П. Родионова, К. Д. Сидорчик, И. А. Солунина, Л. И. Стрельчунас, Г. А. Федорова, Л. В. Лукьянова, О. С. Шерман и др.).

Этому большому коллективу высококвалифицированных специалистов мы обязаны наличием методов анализа в синтезе и технологии производства витаминов из естественного сырья. Их многолетняя работа несомненно способствовала не только разработке рациональных технологических процессов, но также и внедрению в производство новых форм витаминных препаратов.

Учитывая, что настоящая книга должна служить пособием для работников заводских лабораторий и аналитиков смежных областей, автор стремился изложить в ней те практические сведения, которые могут облегчить работу и помочь разобраться в принципе методов. В целях удобства пользования книгой методический материал в ней расположен по отдельным витаминам, что имеет известные преимущества перед другими способами его изложения (например, по классификации органических соединений).

В первой части книги излагаются некоторые общие методы, широко применяемые в лабораториях витаминных заводов; во второй части описываются методы применительно к контролю производства того или иного витаминного препарата.

Каждому методу предпосылается его теоретическое обоснование, далее приводятся техника метода и ряд расчетов, которые помогут практическим работникам дать правильную оценку полученному ими результату. В отдельных случаях для продукта приводятся два или три метода: один из них является официальным, обязательным для характеристики продукта (о чем имеется указание), другие рекомендуются автором как представляющие интерес в научно-исследовательской работе.

Перед описанием методов анализа готового препарата витамина дается краткая характеристика его свойств и значения для организма.

Особо выделен раздел приготовления некоторых реактивов, применяемых при использовании описываемых методов. В книге приведены также литературные источники, которыми могут пользоваться практические работники в своих исследованиях.

Книга не лишена известных недочетов, в частности недостаточно подробно изложены физико-химические методы анализа, что по ряду причин не всегда удавалось осуществить. Некоторые методы, описанные в книге, в связи с изменением технологии производства, возможно, будут меняться. Материал в книге изложен сжато, что связано с ограниченностью объема издания. Однако хочется думать, что и с учетом этих недостатков книга сможет принести некоторую пользу при решении проблемы получения и исследования витаминных препаратов.

Автор будет искренне благодарен за все критические замечания, дополнения и поправки.

Кандидату биологических наук В. М. Иосиковой, оказавшей большую помощь в подготовке книги к изданию, и всем лицам за сделанные поправки и замечания автор выражает глубокую признательность.

Часть первая

КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ О НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕТОДАХ АНАЛИЗА

●

За последние годы в практике лабораторий витаминных заводов все шире используются современные методы анализа: спектрофотометрия, полярография и хроматография на фильтровальной бумаге и в тонком слое.

В настоящем практическом руководстве не представляется возможным подробно изложить теоретические основы этих методов; можно дать лишь самое общее представление о технике их проведения и некоторых принципах, положенных в основу этих методов. По данному вопросу существует обширная литература, широко освещающая теорию и практику спектрофотометрических, полярографических исследований и хроматографии.

Следует лишь отметить, что на современном уровне наших знаний невозможно в ряде случаев обойтись без указанных методов, а тем более в производстве таких сложных органических соединений, каковыми являются витамины.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ[1]

Органические и неорганические соединения, как правило, обладают способностью поглощать часть световых лучей в определенной области спектра. Видимый спектр включает область длин волн между 700 mμ красной части и около 400 mμ фиолетовой. Ультрафиолетовая область спектра находится в пределах от 400 до 200 mμ (за пределами 200 mμ находится область так называемого далекого ультрафиолета). Измерение характера поглощения (абсорбции) света веществом может служить характерным показателем для определенного вещества. Наиболее значительная часть витаминов и полупродуктов их синтеза характеризуется свойством поглощать свет в области от 200 до 600 mμ. Очень часто вещество обладает не одной, а несколькими полосами поглощения в разных частях спектра, и это обстоятельство также может служить для идентификации соединений.

[1] По вопросам спектрофотометрии имеются работы Ю. Я. Михайленко. (1947), В. Генри (1932), Б. Я. Свешникова (1940), О. Н. Сеткиной (1940), П. П. Шорыгина (1944), В. В. Коршака и С. Р. Рафикова (1949), В. М. Чулановского (1951), Ю. С. Ляликова (1948), Мортона (Morton, 1942), А. Гиллем, Е. Штерн (1957) и др.

Так, например, рибофлавин обладает 4 полосами поглощения: при $\lambda=229$, 269, 372 и 445 $m\mu$, а тахистерин — при $\lambda = 268$, 280 и 294 $m\mu$.

Если измерять с помощью спектрофотометра поглощение света испытуемым раствором, начиная, допустим, с 450 $m\mu$, и откладывать на графике величину поглощения на основе показаний прибора через равные отрезки волн, измеряемые в миллимикронах, то вычерчиваемая линия будет иметь некоторый подъем и на длине волны, где происходит поглощение максимального количества света, на кривой будет обозначаться «максимум абсорбции». Сопоставляя полученную спектрограмму с абсорбционной кривой для стандартного, заведомо чистого вещества, можно будет убедиться в идентичности испытуемого продукта стандарту или в наличии в продукте загрязняющих веществ. Величина поглощения, выражаемая экстинкцией[1] 1% раствора вещества, измеряемого в кювете толщиной 1 см ($E^{1\%}_{1\,см}$), является достаточно характерным показателем для взятого соединения. Эта величина, будучи сравнена с $E^{1\%}_{1\,см}$ для чистого, стандартного продукта, выраженная в процентах к стандарту, дает возможность определить с более высокой степенью точности, чем при использовании других аналитических методов, чистоту испытуемого продукта (его процентное содержание).

Приведенный пример является лишь частным случаем спектрофотометрического анализа, но он заслуженно получил в витаминологических исследованиях широкое применение.

Для спектрофотометрического анализа используются различные спектрофотометры. Наиболее часто применялся спектрофотометр типа Бекман. В СССР выпускаются спектрофотометры отличного качества, действующие по принципу спектрофотометра типа Бекмана (рис. 1). Подобные приборы охватывают область спектра от 1200 до 200 $m\mu$ и имеют два фотоэлемента: оксидно-цезиевый для области от 1200 до 600 $m\mu$ и типа RCAC 7032 для области длин волн короче 620 $m\mu$[2].

[1] Экстинкция, или оптическая плотность раствора, является отношением логарифма интенсивности падающего пучка света к интенсивности пучка света, проходящего через испытуемый раствор.

[2] Цит. по ки.: Физические методы органической химии. Т. 4. Под ред. А. Вайсбергера. ИЛ, 1955.

В качестве источника света для ультрафиолетовой области используется водородная лампа низкого напряжения с подогревным катодом, для видимой области — 32-ваттная лампа автомобильного типа.

На рис. 1—2 изображена схема расположения частей в спектрофотометре типа Бекман. По этой же схеме построены приборы, выпускаемые в СССР, спектрофотометры СФ-4.

Основными частями прибора, кроме указанных источников света, являются монохроматор, камера для кварцевых или стеклянных кювет и фотометрическое устройство, позволяющее производить сравнительную оценку световых потоков с применением фотоэлементов. Измерительная шкала на спектрофотометре градуирована таким образом, что позволяет регистрировать измерения в процентах пропускания ($\frac{J}{J_0}100$) или в величине Д (т. е. оптической плотности, $\lg\frac{J_0}{J}$), длины волн на спектрофотометре выражены в миллимикронах.

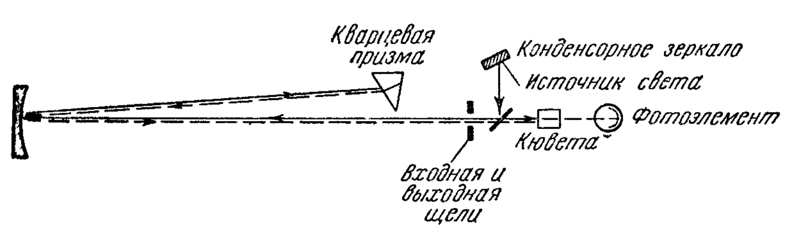


Рис. 1. Ход лучей в спектрофотометре.

При использовании в аналитической практике спектрофотометрии пользуются законом Ламберта — Буга — Бэра, кратко выражающимся формулой:

$$\lg\frac{J_0}{J}=Ecl,$$

где J_0 — интенсивность падающего света;
J — интенсивность света, прошедшего через поглощающую среду (испытуемый раствор);
l — толщина слоя испытуемого раствора;
E — молярный коэффициент погашения;
c — концентрация вещества в г/л.

Очень широко применяется символ $E_{1см}^{1\%}$, который связан с молекулярным коэффициентом погашения $E_{1см}^{моль}$ (Е): $E_{1см}^{1\%} \cdot \frac{M}{10} = Е$, где М — молекулярный вес.

Этой величиной вначале пользовались лишь при определении концентрации витамина А в различных образ-

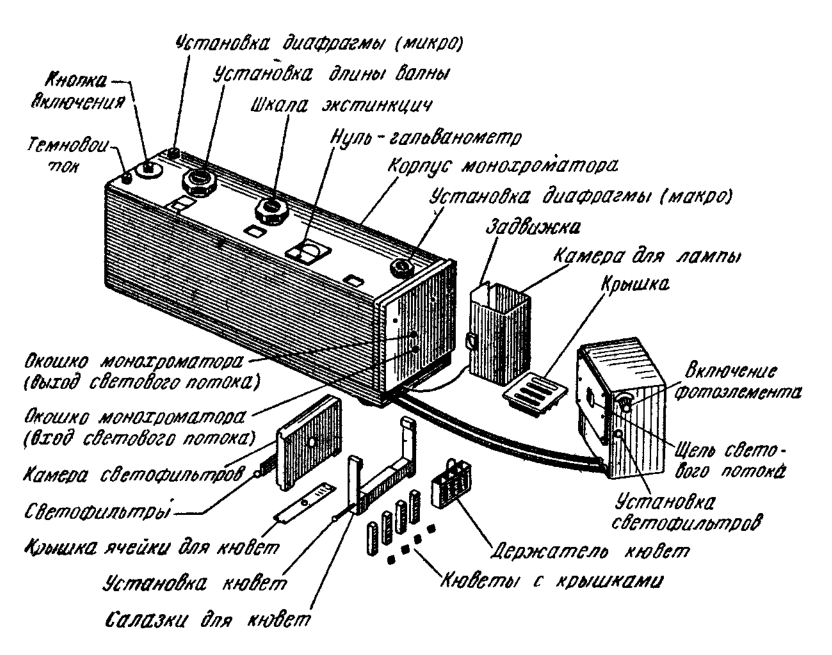


Рис 2 Спектрофотометр типа Бекман (Beckmann bulletin, 89 A)

цах рыбьих жиров, когда еще не был известен молекулярный вес витамина. Но эта величина оказалась очень удобной для характеристики испытуемого продукта. $E_{1см}^{1\%}$ до сих пор не имеет какого-либо общепринятого наименования, им пользуются для характеристики поглощения света каким-либо соединением, независимо от того, известен его молекулярный вес или нет. Эта величина является постоянной лишь при определенной длине волны и в определенном растворителе.

Вычисление $E_{1см}^{1\%}$ раствора испытуемого вещества в кювете толщиной 1 см производят по формуле:

$$E_{1см}^{1\%} = \frac{E_{найд.} v}{a \cdot 100},$$

где $E_{найд.}$ — экстинкция раствора, обнаруженная на спектрофотометре при заданной длине волны;
v — разведение в мл;
a — навеска в г.

Здесь уместно отметить, что измерение максимума абсорбции для той или другой цветной реакции или растворов веществ, обладающих естественной окраской, позволяет выбрать светофильтр с известной длиной волны для последующего его использования при фотоколориметрическом измерении окраски. Так, например, цветная реакция витамина А с треххлористой сурьмой в хлороформном растворе имеет максимум абсорбции света при λ = 620 mμ, следовательно, для этой реакции используют красный светофильтр с максимумом пропускания света при λ = 620 mμ и с поглощением света в соседних областях спектра.

ПОЛЯРОГРАФИЯ

Полярографический метод анализа, детально разработанный Я. Гейровским (1951), основан на интерпретации поляризационных кривых, получающихся при восстановлении или окислении веществ в электролизере, в котором одним электродом является ртуть, падающая каплями из очень тонкого отверстия капиллярной трубки, а другим электродом — неподвижный слой ртути на дне электролизера. По характеру таких поляризационных кривых имеется возможность определить как природу, так и концентрацию восстанавливающихся и окисляющихся веществ, находящихся в растворе.

В некоторых благоприятных случаях на одной полярограмме можно одновременно открыть и определить несколько различных веществ. Метод особенно пригоден для малых концентраций (10^{-6} — 10^{-2} мол/л), и так как для выполнения анализа достаточно очень малого объема

раствора, то можно определить следы вещества. Этот метод применим для определения разнообразных органических веществ и большинства обычных восстанавливающихся неорганических ионов. Это обстоятельство, а также возможность производить одновременно качественный и количественный анализ делают полярографический метод ценным дополнением к существующим химическим методам.

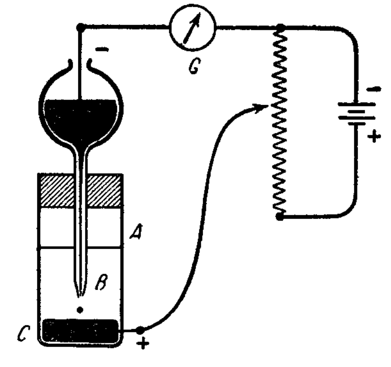


Рис. 3. Простейшая установка для получения кривых силы тока.

А — электролизер; *В* — ртутный капельный электрод (катод), *С* — неподвижный слой ртути (анод).

На капельном электроде восстанавливаются большое количество разнообразных органических веществ, альдегиды и кетоны, ненасыщенные кислоты, нитро- и нитрозосоединения, азо- и диазосоединения, хиноны и многие другие. Все они дают хорошо выраженные волны.

В основе полярографического метода лежит, как уже сказано, электролитический процесс. Электролитические реакции характеризуются прохождением электрического тока между раствором и электродами, и величина силы тока является мерой скорости электродных реакций. В любом электролизере на одном электроде происходит электровосстановление (катод), на другом — электроокисление (анод); оба процесса эквивалентны. Кривая зависимости получаемой силы тока от приложенной к электролизеру электродвижущей силы *э. д. с.* называется кривой силы тока — напряжение. Полярографический анализ и сводится к получению такой кривой зависимости силы тока от напряжения.

На рис. 3 показана простейшая установка для получения кривых сил тока — напряжение (полярограммы), где *А* — электролизер, содержащий исследуемый раствор, *В* — ртутный капельный электрод (катод), *С* — неподвижный слой ртути, являющийся вторым электродом (анод).

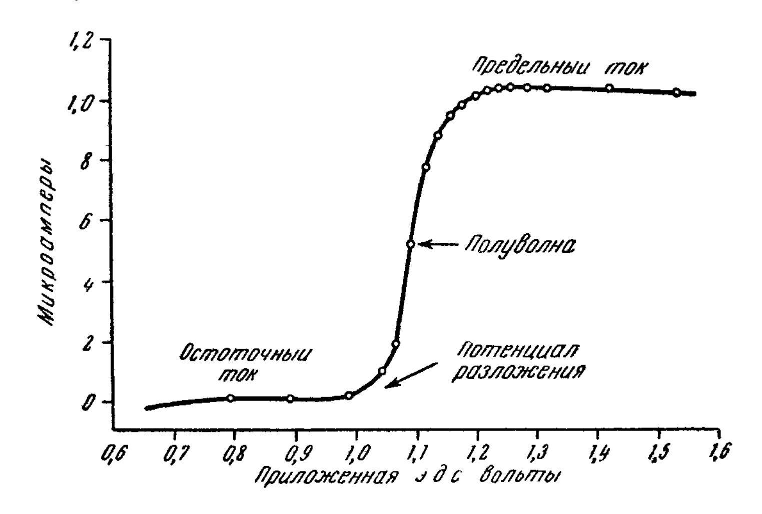


Рис. 4. Поляризационная кривая.

Измерение проходящего через электролизер тока производят включенным в цепь чувствительным зеркальным гальванометром.

Анод вследствие большой величины своей поверхности практически не поляризуется и потенциал его остается постоянным. Поверхность катода непрерывно обновляется. Благодаря этому исключается возможность осложнения картины электролиза какими-либо побочными явлениями, вызванными накоплением восстанавливающихся веществ на катоде. Это свойство ртутного капельного электрода обеспечивает воспроизводимость и обратимость электролитического процесса.

На рис. 4 представлена поляризационная кривая. Как видно, через электролизер вначале протекает только

чрезвычайно слабый, так называемый остаточный ток до тех пор, пока не достигнут потенциал разложения испытуемого вещества. С этого момента начинается непрерывный электролиз, сила тока растет. Она не увеличивается беспрерывно, но постепенно подходит к пределу и,

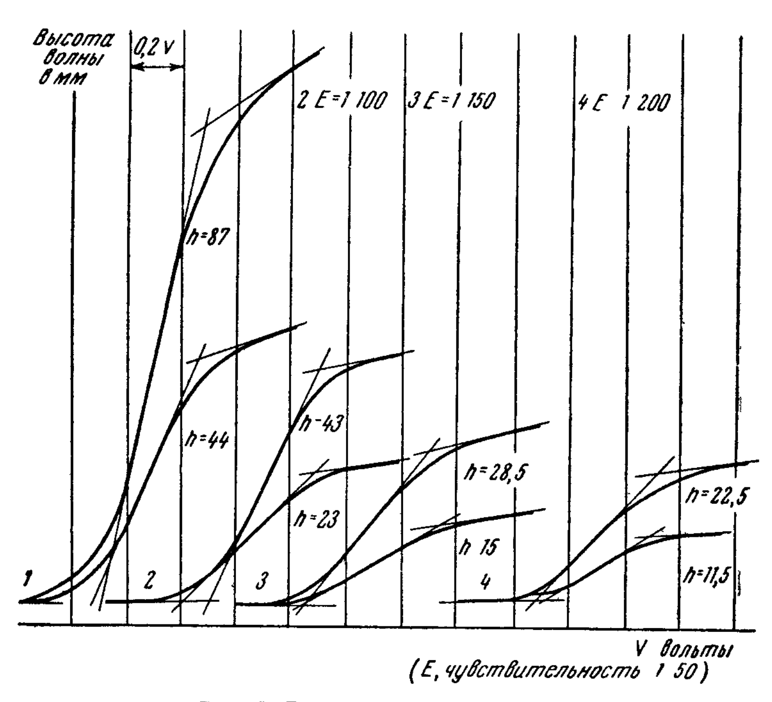


Рис 5 Восстановление тиамнна

наконец, становится постоянной и независимой от приложенной *э. д. с.* Высота предельного тока прямо пропорциональна количеству вещества, поступающего из раствора к поверхности катода (рис. 5).

Для качественной характеристики испытуемого объекта достаточно графически определить потенциал полуволны (середину полярографической волны); он зависит не от концентрации восстанавливаемого вещества, а только от его природы.

Одной из помех при полярографировании является растворенный кислород, восстанавливающийся раньше

многих других веществ; его удаляют предварительным пропусканием через испытуемый раствор азота. Подавление кислородной волны может быть также достигнуто

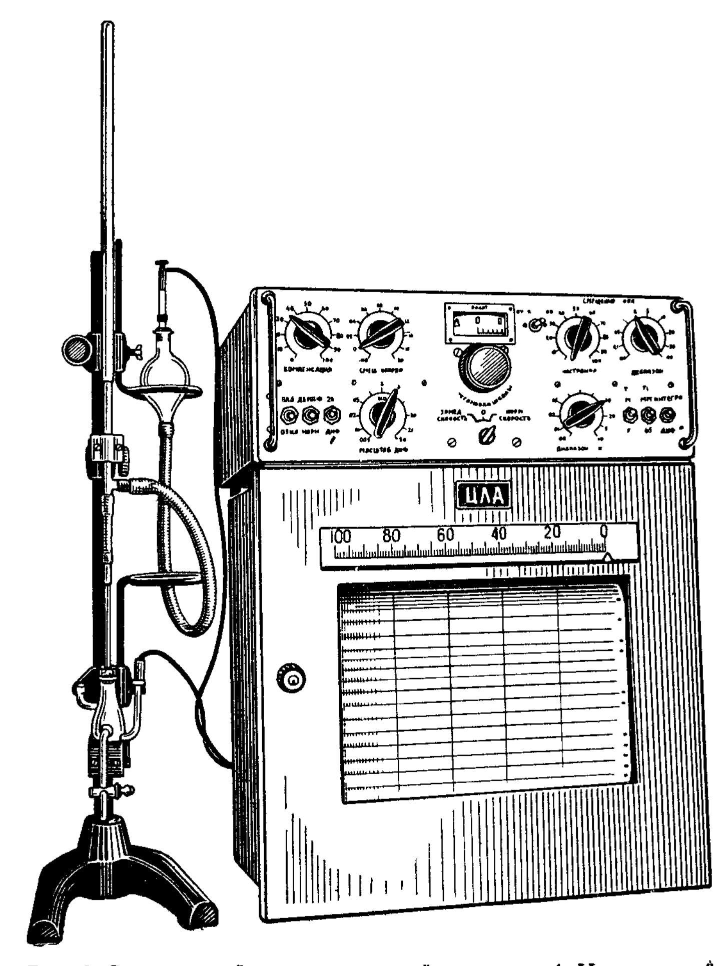


Рис 6 Электронный регнстрнрующий полярограф Центральной лаборатории автоматики Энергочермета

добавлением к поляризуемому раствору 0,1% раствора желатины.

В настоящее время имеется много систем полярографов; в частности, в СССР выпускаются прецизионные ав-

торегистрирующие полярографы центральной лабораторией автоматики Энергочермета. Эти полярографы просты в работе и позволяют получать отчетливо выраженные полярограммы автоматическим путем (рис. 6).

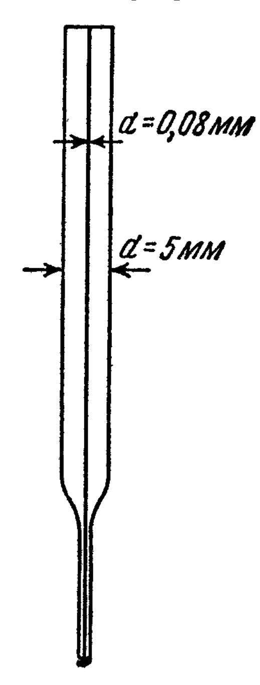


Рис 7. Капилляр с припаянной «лопаточкой»

Несмотря, однако, на различие систем полярографов, принцип работы с ними заключается лишь в том, что вначале необходимо подобрать такой раствор («фон»), в котором испытуемое вещество при восстановлении на электроде давало бы наиболее четкую волну восстановления В качестве таких фонов применяют растворы кислот, щелочей, некоторых солей, буферные растворы с определенным значением pH, а также используются четвертичные аммонийные основания. Полученная кривая восстановления сравнивается с кривой для стандартного чистого вещества, что дает возможность не только идентифицировать данное соединение, но и определить его количество в испытуемом растворе.

Детальное описание различных методов полярографического анализа изложено многими авторами, в частности Я. Гейровским (1937, 951).

Для правильной работы полярографа имеет большое значение постоянство массы ртути, вытекающей из капилляра, в связи с чем капилляр подбирается такого диаметра, чтобы в течение 3 секунд из него вытекало постоянное количество ртути (1 капля), что устанавливается при помощи секундомера. Для этих целей более всего подходят капилляры с внешним диаметром 0,5 см и внутренним просветом 0,08 мм.

Во избежание осцилляции часто к концу капилляра, как это показано на рис. 7, припаивается капелька стекла («лопаточка»), о которую вытекающая капля ртути разбивается, создавая равномерное напряжение в электролитической сети.

Большое значение имеет также температура раствора, при которой снимается полярограмма. Для этой цели удобно пользоваться специальными электролитическими ячейками, снабженными рубашкой, в которую пропускается вода из термостатированной бани. Рекомендуется для этой цели применять ультратермостатные бани, позволяющие регулировать температуру воды до 0,1°.

С помощью полярографических методов удается провести определение таких веществ в смеси, как, например, альфа-ионон, бета-ионон, псевдоионон, в связи с различным потенциалом их восстановления, что при помощи других методов, даже спектрофотометрических, не всегда удается.

ХРОМАТОГРАФИЯ НА БУМАГЕ

За последние годы хроматография на бумаге различных соединений, в том числе и витаминов, получила широкое распространение. С помощью хроматографии на бумаге удается разделить сложные смеси близких по своим свойствам или родственных соединений. При этом метод разделения настолько прост, что доступен для осуществления в любой лаборатории.

Наиболее прост и удобен метод восходящей хроматографии, который осуществляется следующим образом. в стеклянный цилиндр или какой-либо другой подходящего объема сосуд, герметически закрывающийся пробкой (можно пользоваться вегетационными сосудами с пришлифованной стеклянной пластинкой и т. п.), наливают слоем 4—5 см подходящий растворитель. Хроматографическую бумагу разрезают на полоски шириной 5—6 см и такой длины, чтобы, будучи помещены в цилиндр, они могли быть подвешены строго вертикально (рис. 8).

На полоску хроматографической бумаги наносят микропипеткой 0,01—0,001 мл испытуемого раствора (в соответствующем разведении), а рядом (на расстоянии 2—3 см) — такое же количество стандартного раствора в качестве «свидетеля» с точно известной концентрацией. Обе капли должны находиться на строго горизонтальной линии, которую обычно проводят на бумаге; каждую из них очерчивают карандашом («линия старта»). Полоски подвешивают при помощи стеклянных крючочков

или другим способом к пробке цилиндра; при этом нижний конец полоски должен быть погружен на 0,5—1 см в налитый на дно цилиндра растворитель, а нанесенные капли должны располагаться на 1—2 см выше растворителя.

Цилиндр закрывают и оставляют на несколько часов (от 3 до 20), пока растворитель не продвинется на воз-

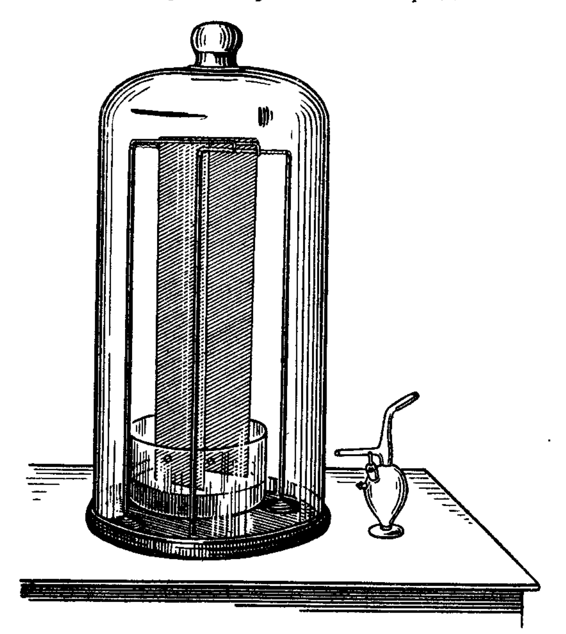


Рис. 8. Хроматографическая камера.

можную высоту полоски. Нельзя допускать продвижение растворителя на всю длину полоски.

После этого полоски вынимают из цилиндра, просушивают (на воздухе, у открытой дверки вытяжного шкафа или в сушильном шкафу в зависимости от характера анализируемого вещества) и затем при помощи стеклянного пульверизатора обрызгивают их проявляющим реактивом. Тотчас же после высушивания на полосках проступают пятна: одно пятно — «свидетеля», другое пятно — вещества, находящегося в анализируемом растворе.

При помощи миллиметровой линейки или миллиметровой бумаги измеряют расстояние (в миллиметрах)

от места нанесения пятна («старт») до той линии, на которую поднялся растворитель («фронт растворителя»),— «а» и расстояние от места нанесения пятна до места его нового положения на хроматограмме («фронт вещества») — «b». При одних и тех же условиях (качество бумаги, растворитель, температура и время разгонки хроматограммы) высота подъема растворителя и исследуемого вещества по бумаге будет одинаковой и строго постоянной для каждого отдельного вещества. Эту высоту можно вычислить, исходя из отношения «фронта вещества» к «фронту растворителя». Эту величину принято обозначать R_0 («фронт разгонки»), она всегда меньше единицы:

$$R_f = \frac{b}{a}$$

Если R_f пятна испытуемого вещества в точности совпадает с R_f пятна стандарта, то это значит, что в испытуемом растворе содержится только то вещество, что было принято аналитиком в качестве стандарта. На рис. 9 дан пример хроматографического разделения фосфорных эфиров тиамина.

В большинстве случаев исследуемая смесь на хроматограмме дает два, три или более пятен, что указывает на наличие в ней соответственно двух, трех или более соединений. Для того чтобы охарактеризовать эти соединения, необходимо в качестве свидетелей применять те соединения, наличие которых предполагается в испытуемом растворе. В последнем случае в качестве свидетеля применяют смесь этих веществ или, что более правильно, на линии старта рядом с испытуемым раствором наносят капли всех предполагаемых в растворе веществ.

Так, если анализируется раствор пентоз, в качестве свидетелей применяют рибозу, арабинозу и другие углеводы, присутствие которых подразумевается в испытуемом растворе.

Пятна испытуемого раствора на бумаге должны иметь те же значения Rf, что и «свидетели»; если же это не соблюдается, значит в растворе содержатся какие-то другие, неидентифицированные соединения.

Очень удобен также способ радиальной хроматографии, значительно сокращающий время исследования и позволяющий на одной хроматограмме размещать 6—8 и более испытуемых веществ. Для этого на дно эксикатора

ставят чашку с выбранным растворителем, на вставку эксикатора накладывают диск из фильтровальной бумаги, в центре которого делают отверстие и через него пропускают туго скрученный фитиль из фильтровальной бумаги, опускающийся в растворитель. Капли размещают строго по окружности на расстоянии 1—2 см от центра диска.

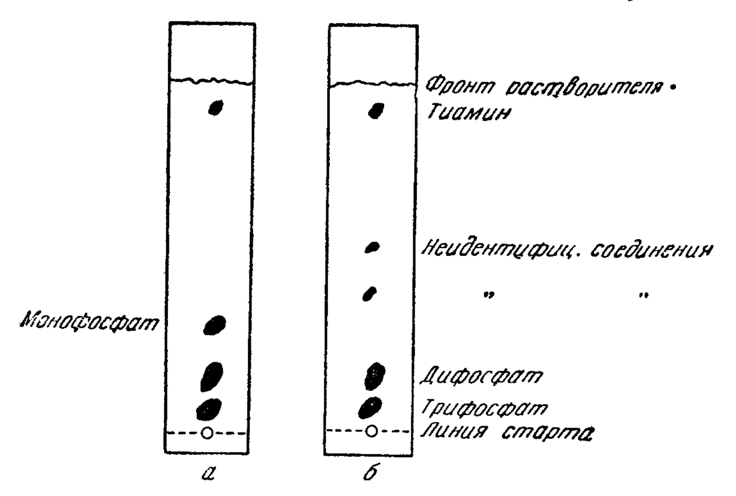


Рис. 9. Пример хроматографического разделения фосфорных эфиров тиамина.
а — «свидетели», б — исследуемый продукт

Разгонку хроматограмм можно осуществить за 3—4 часа. Этим способом удается разделить и качественно определить состав разных сложных смесей и выделить из этих смесей одно или несколько индивидуальных веществ.

Обычно не ограничиваются только качественным разделением смеси; большей частью бывает необходимо определить количество отдельных компонентов в смеси. Для этого поступают следующим образом: в цилиндр помещают в совершенно одинаковых условиях на одной и той же высоте две полоски бумаги и хроматографируют, как описано. После высушивания обеих полосок одну из них проявляют, другую не проявляют, но накладывают на первую (проявленную), очерчивают на непроявленной полоске расположение пятен проявленной полоски и очерченные места аккуратно вырезают. Вырезанные участки с непроявленной полоски подвергают экстракции подходящим растворителем (вода, органические растворители и т. п.). Полученные растворы доводят в мерных колбах до нужного объема и подвергают анализу одним из принятых для этих веществ методом, учитывая, что концентрация вещества в них обычно составляет гаммы или десятки гамм.

Зная концентрацию исходного вещества в объеме, нанесенном на хроматограмму (обычно 0,01 мл), нетрудно рассчитать процентное содержание исследуемых веществ в смеси. Широко распространен также анализ полученных растворов при помощи спектрофотометра, что значительно сокращает сроки проведения исследования и дает точные результаты.

С помощью хроматографии на бумаге можно отделить витамин А от продуктов его распада, разделить различные формы витамина A, D, E, K, разделить витамины группы В и их дериваты, идентифицировать витамин B_{12}, отделить витамин С от продуктов его превращения, разделить флавоновые вещества и кахетины и т. п. Краткий обзор по этому вопросу составлен еще в 1958 г. (В. А. Девятнин).

По теории и технике хроматографического анализа на бумаге имеется обширная литература. В частности, этот вопрос подробно освещается в ряде работ [Р. Блок, Р. Лестранж, Г. Цвейг, 1954; В. В. Рачинский, Т. Б. Гапон, 1953; Ф. М. Шемякин, Э. С. Мицеловский, Д. В. Романов, 1955; Г. В. Самсонов, 1955; Хайс и Мацек (Hais, Macek, 1958); сборник «Хроматография» под редакцией Опинского (Opiensky, 1957)].

Здесь мы не касаемся техники хроматографии в тонком слое, на стеклянных или фарфоровых пластинках. Этому разделу хроматографии посвящена специальная литература.

Часть вторая

ОПИСАНИЕ СПЕЦИАЛЬНЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА В ПРОИЗВОДСТВЕ ВИТАМИНОВ

●

Материал в настоящем разделе расположен в следующем порядке: витамин А, витамины группы В, витамины С, D, Е, К, Р и т. д., что представляет известные удобства для отыскания нужных сведений.

Описываемые в настоящем разделе методы разрабатывались в химико-аналитической лаборатории и других лабораториях ВНИВИ, инженерами и техниками витаминных заводов, заимствованы из смежных отраслей промышленности. Эти методы прошли определенную проверку в производственных условиях и используются в практике контроля производства.

В этом разделе изложены методы контроля в производстве синтетических витаминов А, B_1, B_2, B_6, РР, пара-аминобензойной, пантотеновой и фолиевой кислот, витамина С (синтетического и естественного), а также витаминных препаратов, получаемых из естественного сырья (витамины D, Е, Р, B_{12}). По ряду продуктов приводится несколько методов, которые могут быть использованы в лабораториях, и их следует рассматривать как рекомендуемые автором книги.

Описание приготовления некоторых реактивов выделено в самостоятельный раздел.

Методы контроля в синтезе витамина А

МЕТИЛВИНИЛКЕТОН

$CH_3COCH=CH_2$ C_4H_6O

Бесцветная легкоподвижная жидкость, т. кип. 80—81°, м. вес 70. Уд. вес при 20°—0,86. Хорошо растворим в органических растворителях, смешивается с водой. Неустойчив при хранении и легко полимеризуется, поэтому его хранят при температуре не выше 5° с добавлением небольшого количества гидрохинона. В производстве метилвинилкетон получают из винилацетилена:

$$HC\equiv C-CH=CH_2 \xrightarrow{H_2O} CH_3COCH=CH_2$$

По условиям технологического процесса метилвинилкетон не должен содержать более 0,5% влаги.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛАЖНОСТИ ПО ФИШЕРУ

Точную навеску метилвинилкетона в количестве 2—3 г титруют в сухой колбе реактивом Фишера до перехода окраски от желтой в красно-бурую.

Расчет содержания влаги в процентах (x) производят по формуле·

$$x=\frac{v\cdot K\cdot 100}{a},$$

где v — количество реактива Фишера, пошедшее на титрование, в мл;
K — титр реактива Фишера (должен быть от 0,003 до 0,004);
a — навеска в г.

ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТИЛВИНИЛКЕТОНА И ФОРМАЛЬДЕГИДА

Метод полярографического определения метилвинилкетона и формальдегида (если в продуктах синтеза присутствует ацетон, он не мешает определению) разработан в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ В. А. Девятниным и И. А. Солуниной.

Определение метилвинилкетона

Полярографические кривые метилвинилкетона снимают на фоне ацетатного буферного раствора (pH=3) в водной среде с добавлением 0,1% раствора желатины. Потенциал восстановления метилвинилкетона в описанных условиях — 0,95 в. Полученные кривые оценивают по калибровочной кривой, построенной по стандартному препарату.

Присутствие формальдегида не мешает определению, так как в кислой среде формальдегид не восстанавливается.

Определение. Точную навеску испытуемого вещества в количестве 50—100 мг, взятую в колбе с притертой пробкой, в которую предварительно налито около 10 мл дистиллированной воды, переносят (дистиллированной водой) в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят объем раствора водой до метки. Для определения в эрленмейеровскую колбу с притертой пробкой отбирают пипеткой из полученного раствора 1—2 мл из расчета содержания 0,5—1 мг метилвинилкетона и доводят общий объем раствора дистиллированной водой до 10 мл. К содержимому колбы приливают 1 мл 0,1% раствора желатины и 9 мл ацетатного буферного раствора (pH = 3) и снимают полярографическую кривую. Для этого полученный раствор помещают в ячейку полярографа, пропускают в течение 3—5 минут ток азота и затем производят съемку полярограммы, начиная с 0,8 в.

Оценку полярограммы производят сравнением со стандартным препаратом по калибровочному графику. Расчет процентного содержания метилвинилкетона (x) производят по следующей формуле:

$$x = \frac{v \cdot C \cdot v_2 \cdot 100}{a \cdot v_1},$$

где v — объем, в котором растворена навеска, в мл;
C — количество метилвинилкетона, найденное по калибровочному графику, в мг;
v_1 — объем раствора, взятый для полярографирования, в мл;
a — навеска в мг;
v_2 — общий объем раствора, взятый для полярографирования, в мл;
100 — пересчет в %.

Построение калибровочного графика. В колбе с притертой пробкой, содержащей около 10 мл дистиллированной воды, взвешивают 50 мг стандартного препарата метилвинилкетона. Содержимое колбы переносят дистиллированной водой в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят объем водой до метки. Для построения калибровочного графика в эрленмейеровские колбы с притертыми пробками отбирают количество раствора, соответствующее 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75 мг метилвинилкетона, и доводят объем каждого из них водой до 10 мл. В каждую колбу добавляют по 1 мл 0,1% раствора желатины и по 9 мл ацетатного буферного раствора (pH = 3). Полученные растворы поочередно помещают в ячейку полярографа, пропускают в течение 3—5 минут ток азота и производят съемку полярографической кривой начиная с 0,8 в.

Калибровочный график зависимости величины диффузионного тока от концентрации метилвинилкетона в растворе строят, откладывая по оси абсцисс концентрации раствора в мг/мл, а по оси ординат — соответствующие им высоты волн величины диффузионного тока в µA.

Определение формальдегида

Полярографические кривые формальдегида снимают на фоне 0,1 н. раствора LiOH в водной среде с добавлением 0,1% раствора желатины. Потенциал восстановления формальдегида в описанных условиях — 1,55—1,6 в.

Полученные полярограммы оценивают по калибровочному графику.

Определение. В мерной колбе емкостью 25 мл взвешивают 0,2—0,3 г испытуемого вещества, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки. Для определения отбирают пипеткой количество раствора, соответствующее содержанию в нем 3—6 мг формальдегида, в эрленмейеровскую колбу с притертой пробкой, доводят объем раствора дистиллированной водой до 10 мл, затем добавляют 1 мл 0,1% раствора желатины и 9 мл 0,1 н. раствора LiOH[1] и снимают полярографическую кривую, как описано выше.

Расчет процентного содержания формальдегида (x) производят, пользуясь калибровочным графиком, по следующей формуле:

$$x = \frac{v \cdot C \cdot v_2 \cdot 100}{a\ v_1},$$

где v — объем, в котором растворена навеска, в мл;
C — количество формальдегида, найденное по калибровочному графику, в мг/мл;
a — навеска вещества в мг;
v_1 — объем раствора, взятый для полярографирования, в мл;
v_2 — общий объем раствора, взятый для полярографирования, в мл;
100 — пересчет в %.

Построение калибровочного графика. В мерной колбе емкостью 25 мл взвешивают 0,25 г формалина, содержащего 36—40% формальдегида (определенного по Госфармакопее СССР IX издания) или гидроксиламиновым методом растворяют в дистиллированной воде и объем раствора доводят до метки.

Для построения калибровочного графика отбирают пипеткой в колбы с притертыми пробками количества раствора, соответствующие 1,75; 3,5; 10,5; 14 мг формальдегида и доводят объем каждого из них дистиллированной водой до 10 мл, затем добавляют по 1 мл 0,1% раствора желатины и по 9 мл 0,1 н. раствора LiOH и снимают для каждого раствора полярографическую кривую, как описано выше, начиная с 1,4 в.

[1] Приготовленне по общим правилам объемного анализа

Калибровочный график строят, откладывая по оси абсцисс концентрации раствора формальдегида в мг/мл, а по оси ординат — соответствующие им высоты волн величины диффузионного тока в μA.

МЕТИЛ-3-ПЕНТЕН-2-ИН-4-ОЛ-1

(Первичный ацетиленовый карбинол)

$$HC \equiv C - \underset{\displaystyle CH_3}{\overset{}{C}} = CH - CH_2OH \qquad C_6H_8O$$

(группа CH_3 при втором атоме углерода)

М. вес 96

Бесцветная подвижная жидкость, т. кип. 92—95° при 45 мм, $n_D^{20} = 1{,}4834$. Уд. вес при 20° — 0,913. Растворим в эфире, хлористом метилене, ограниченно растворим в воде. При стоянии темнеет. Хранят в ампулах, запаянных под азотом.

Метод определения первичного ацетиленового карбинола разработан в синтетической лаборатории ВНИВИ Г. И. Самохваловым и М. А. Миропольской. Этот метод основан на реакции образования растворимых ацетиленидов с выделением свободной азотной кислоты при взаимодействии ацетилена с концентрированными растворами азотнокислого серебра

$$HC \equiv CH + 8AgNO_3 \rightarrow AgC \equiv CAg \cdot 6AgNO_3 + 2HNO_3.$$

В аналогичную реакцию вступают также производные ацетилена.

В случае метил-3-пентен-2-ин-4-ол-1 реакция протекает по уравнению:

$$HC \equiv C - \underset{CH_3}{C} = CH - CH_2OH + 7AgNO_3 \rightarrow AgC \equiv C - \underset{CH_3}{C} = CH -$$
$$- CH_2OH \cdot 6AgNO_3 + HNO_3.$$

Выделяющуюся при этом азотную кислоту определяют титрованием.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

(по прописи Г. И. Самохвалова и М. А. Миропольской)

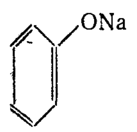
К 20 мл 2 м. раствора $AgNO_3$ добавляют не более 3—4 капель индикатора метилового красного, нейтрализуют 0,1 н. раствором щелочи, в раствор вносят точную

навеску карбинола в количестве 0,1 г и после ее растворения выделившуюся азотную кислоту оттитровывают 0,1 н. раствором КОН до появления желтого окрашивания. Расчет процентного содержания карбинола (x) производят по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0,0063 \cdot 1,523 \cdot 100}{a},$$

где a — навеска карбинола в г;
1,523 — постоянный коэффициент[1];
v — количество точного 0,1 н. раствора КОН, пошедшее на титрование, в мл;
0,0063 — количество HNO_3, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора КОН, в г.

ФЕНОЛЯТ НАТРИЯ



C_6H_5ONa
М. вес 116

Белый мелкокристаллический гигроскопический порошок.

В контроле производства с продуктом производят качественную реакцию и определяют его влажность по прописи Г. И. Самохвалова и М. А. Миропольской (синтетическая лаборатория ВНИВИ).

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ФЕНОЛ

Растворяют 2 г продукта в 1 мл 96% этилового спирта, добавляют 2 капли 1% спиртового раствора $FeCl_3$. Раствор окрашивается в зеленый цвет, переходящий при разбавлении водой в фиолетовый.

Определение влажности

Точную навеску фенолята в количестве около 1 г высушивают в высушенном и взвешенном бюксе в вакуум-эксикаторе над твердым NaOH в течение суток и взвешивают. Содержание влаги вычисляют обычным путем.

[1] Показывает отношение метил-3-пентен-2-ин-4-оп-1 к HNO_3 в г/мол

ЦИТРАЛЬ

$C_{10}H_{16}O$ М вес 152,1

Существует в виде следующих изомеров:

Цитраль a: $(H_3C)_2C = CH - CH_2 - CH_2 - C - CH_3$; $H - C - COH$ (двойная связь между C)

Цитраль b. $(H_3C)_2C = CH - CH_2 - CH_2 - C - CH_3$; $HOC - C - H$ (двойная связь между C)

Изоцитраль. $(H_3C)_2C = CH - CH_2 - CH = C(CH_3) - CH_2 - COH$

Таким образом, природный цитраль является смесью двух или более изомерных алифатических альдегидов, обладающих одинаковой эмпирической формулой.

Цитраль представляет собой жидкость с приятным лимонным запахом, бледно-желтого цвета. Отдельные изомеры цитраля различаются по своим свойствам (табл. 1).

Таблица 1
Физико-химические свойства цитраля

Изомер	Точка кипения при 12 мм	n_D^{20}	Удельный вес (при 20°)
Цитраль a	110—112°	1,4891	0,8898
» b	102—104°	1,4891	0,8888
Изоцитраль	95—97°	—	0,8860

Цитраль оказывает противогистаминное действие, в больших разведениях (1:10 000 или 1:100 000) расширяет сосуды и вызывает снижение кровяного давления (Н. А. Преображенский, Э. И. Генкин, 1953). Используется в медицинской практике

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Метод разработали М. Гернох, И. Докупил и Б. Чутни (1953). Излагается по прописи В. И. Колтуновой (химико-аналитическая лаборатория ВНИВИ).

Составление калибровочного графика. Точную навеску чистого цитраля в количестве 0,05 г переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, растворяют в 96% этиловым спирте и доводят объем раствора спиртом до метки. Из полученного раствора после его тщательного перемешивания отбирают в ряд колб количества раствора, соответствующие 1, 2, 3, 4, 5 мг цитраля, и добавляют в каждую из колб этиловый спирт до 5 мл и по 10 мл 0,5 н. раствора HCl. Полученные растворы помещают в электролитическую ячейку полярографа, термостатируют (25°), пропускают ток азота и снимают полярограммы начиная от — 0,6 в. Измеряют высоты волн полученных кривых и откладывают их на графике соответственно концентрации цитраля в растворах.

Потенциал восстановления полуволны цитраля $E_{\frac{1}{2}} = -0{,}9$ в.

Техника метода. Определение содержания цитраля в испытуемом образце проводится в точности так, как описано при составлении калибровочного графика.

Содержание цитраля в испытуемом продукте в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{b \cdot v \cdot 100 \cdot v_2}{a \cdot v_1 \cdot 1000},$$

где a — навеска в г;

$в$ — количество цитраля, найденное по калибровочному графику, в объеме, взятом для полярографирования, в мг;

v — объем, в котором разведена навеска, в мл;

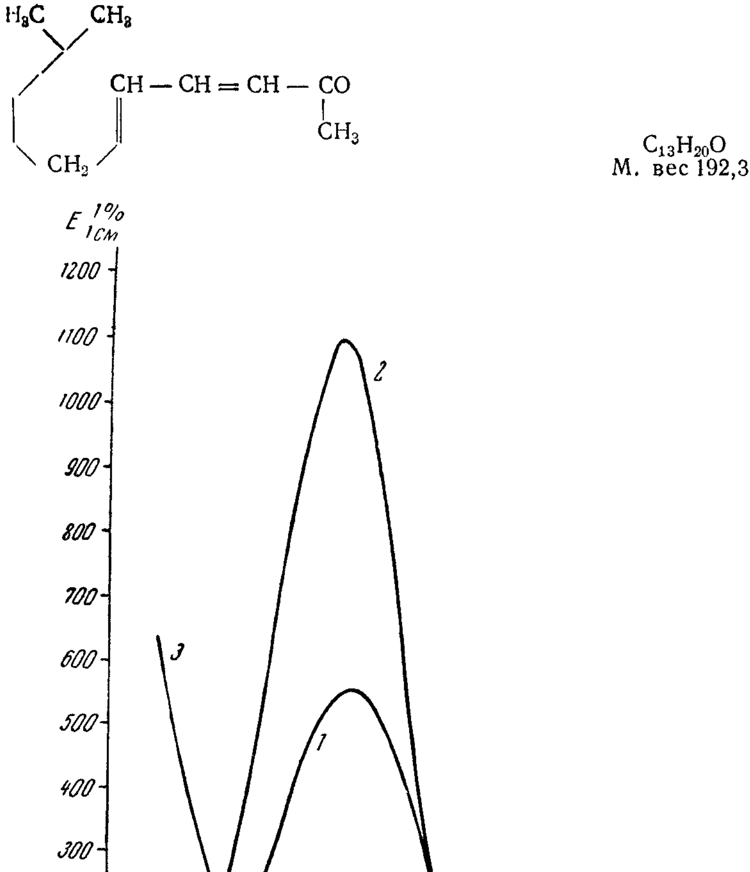
v_1 — объем раствора, взятый для полярографирования, в мл;

v_2 — общий объем, взятый для полярографирования, в мл;

100 — пересчет в %.

Примечание. В этих же условиях может быть проведено определение псевдононона (потенциал восстановления полуволны $E_{\frac{1}{2}} = -0{,}7$ в).

ПСЕВДОИОНОН



$C_{13}H_{20}O$
М. вес 192,3

Рис. 10. Абсорбционные кривые изомеров ионона.

1 — β-ионон n_D^{20} — 1,5208, 2 — ψ-ионон n_D^{20} — 1,5295; 3 — α-ионон n_D^{20} — 1,4390.

Желтоватая маслянистая жидкость со слабым запахом ионона. Т. кип. 115—120° при 3 мм. Уд. вес 0,9 Хорошо растворим в органических растворителях.

В химико-аналитической лаборатории ВНИВИ Л. Н. Кравчиной сняты абсорбционные кривые для псевдоионона, не описанные в литературе. Согласно полученным данным, псевдоионон имеет максимум поглощения при $\lambda = 291$ mμ, тогда как максимум поглощения для β-ионона лежит при $\lambda = 296$ mμ, а α-ионон при этих длинах волн абсорбционного максимума не имеет (рис. 10), что дало возможность предложить спектрофотометрический способ определения псевдоионона, который в ряде случаев может явиться единственно возможным в контроле производства витаминных препаратов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

(по прописи Л. Н. Кравчиной, химико-аналитическая лаборатория ВНИВИ)

Точную навеску ψ-ионона в количество около 0,05 г растворяют в 96% этиловом спирте в мерной колбе емкостью 25 мл и доводят до объема спиртом. Из полученного раствора отбирают для второго разведения 0,1 мл в мерную колбу емкостью 50 мл и доводят спиртом до метки. Поглощение света испытуемым раствором измеряют на спектрофотометре при длине волны 291 mμ.

Полученное показание поглощения пересчитывают на экстинкцию 1% раствора по формуле:

$$E_{1см}^{1\%} = \frac{E \cdot v \cdot v_2}{a \cdot 100 \quad v_1},$$

где E — показание плотности для ψ-ионона при $\lambda = 291$ mμ;
v — объем первого разведения в мл;
v_1 — количество первого разведения, взятое для второго разведения, в мл;
v_2 — объем второго разведения в мл.
a — навеска в г;
100 — пересчет на 1% раствор.

Определение величины экстинкции для испытуемого раствора и раствора стандартного образца ψ-ионона производится аналогичным образом.

Зная экстинкцию стандарта и испытуемого образца, производят расчет содержания псевдоионона в испытуемом образце в процентах (x) по формуле:

$$x = \frac{E \cdot 100}{1203},$$

где E — $E_{1см}^{1\%}$ для испытуемого образца;
100 — пересчет в %;
1203 — $E_{1см}^{1\%}$ для взятого в качестве стандарта образца ψ-ионона.

β-ИОНОН

H_3C CH_3 — $CH = CH — \underset{CH_3}{O}$ — CH_2 — CH_3

$C_{13}H_{20}O$
М. вес 192

Маслянистая жидкость бледно-желтого цвета с очень сильным характерным запахом, в больших концентрациях напоминающим запах кипариса, в малых—запах фиалок. Т. кип. 114—116° при 3 мм. Уд. вес 0,94. Хорошо растворим в органических растворителях, плохо—в воде.

β-ионон может быть загрязнен α-иононом. Определение чистоты β-ионона в данном случае может быть определено измерением коэффициента преломления. Для этой цели в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ Л. Н. Кравчиной составлена таблица, позволяющая определить процентное содержание β-ионона в образце с учетом примеси α-ионона в количестве от 1 до 28% (табл. 2).

Рефрактометрический способ может служить для ориентировочных целей. Вместе с тем для анализа β-ионона предложены и другие методы.

В инструкции по методам контроля в синтезе витамина А Пражского института биохимии и фармации описаны спектрофотометрический и полярографический

Таблица 2

Показатели преломления для смеси β- и α-ионов при разных температурах измерения

Наименование	Процент примеси α ионона	Рефракция при температуре				
		19°	19,5°	20°	20,5°	21°
β ионон 100%	—	1,5211	1,5210	1,5208	1,5205	1,5202
α ионон 100%	—	1,4995	1,4991	1,4989	1,4985	1,4984
смеси	28,6	1,5148	1,5146	1,5142	1,5140	1,5138
	26,2	1,5152	1,5150	1,5148	1,5146	1,5143
	23,8	1,5159	1,5156	1,5153	1,5145	1,5142
	19,7	1,5169	1,5169	1,5160	1,5160	1,5153
	19,3	1,5168	1,5166	1,5162	1,5161	1,5158
	15,0	1,5178	1,5178	1,5175	1,5173	1,5166
	13,5	1,5178	1,5180	1,5178	1,5174	1,5172
	11,0	1,5187	1,5184	1,5182	1,5178	1,5175
	10,6	1,5187	1,5184	1,5181	1,5178	1,5175
	8,4	1,5190	1,5188	1,5185	1,5183	1,5180
	7,0	1,5195	1,5192	1,5190	1,5188	1,5184
	4,8	1,5200	1,5198	1,5196	1,5193	1,5190
	3,7	1,5203	1,5202	1,5200	1,5198	1,5196
	1,1	1,5207	1,5204	1,5203	1,5201	1,5198

методы определения β-ионона[1]; Л. Н. Кравчиной в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ эти методы подверглись проверке и дали хорошие результаты. Ниже излагаются спектрофотометрический и полярографический методы с некоторыми изменениями и уточнениями, которые были внесены в процессе работы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

(по прописи Л Н. Кравчиной)

Точную навеску β-ионона в количестве около 0,05 г растворяют в 96% этиловом спирте в мерной колбе емкостью 25 мл и доводят спиртом до метки. Из полученного раствора отбирают 0,1 мл в мерную колбу емкостью 25 мл и доводят спиртом до метки. Поглощение света полученным раствором измеряют на спектрофотометре при $\lambda = 296$ mμ. Полученное показание плотности пересчитывают на $E^{1\%}_{1см}$ по формуле

$$E^{1\%}_{1см} = \frac{E \cdot v \cdot v_2}{a \cdot 100 \ v_1},$$

где E — показание плотности, найденное при $\lambda = 296$ mμ;
v — объем первого разведения в мл;
v_1 — количество первого разведения, взятое для второго разведения, в мл;
v_2 — объем второго разведения в мл;
a — навеска β-ионона в г;
100 — пересчет на 1% раствор.

Определение величины экстинкции для анализируемого образца β-ионона, принятого в качестве стандартного, проводится аналогично. Величину экстинкции

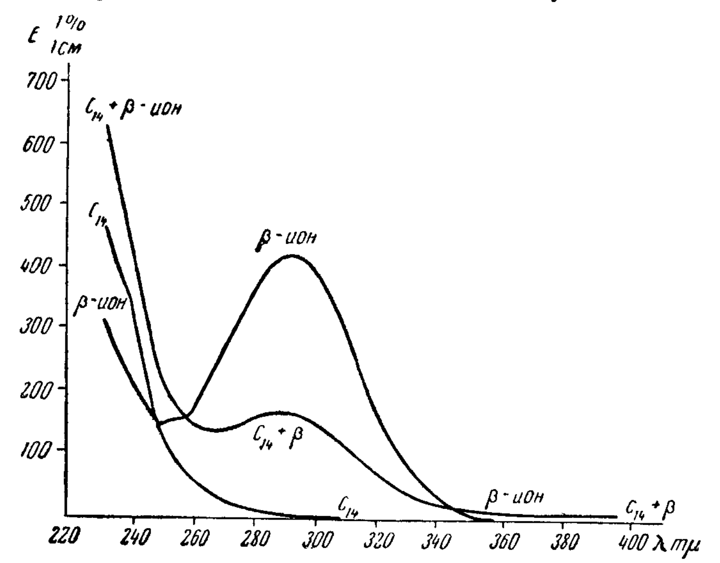


Рис 11 Абсорбционные кривые альдегида C_{14}, β ионона и их смеси

стандарта находят предварительно повторением взятия навесок и разведений и последующих измерений для установления настоящей величины, которая затем и принимается при всех расчетах.

[1] Инструкция по методам контроля Институт биохимии и фармации Прага, 1956

Зная экстинкцию для стандарта и для испытуемого образца, производят расчет процентного содержания β-ионона (x) в испытуемом образце по формуле:

$$x = \frac{E_1 \cdot 100}{553},$$

где E_1 — $E^{1\%}_{1\,см}$ для испытуемого, найденная;

553 — $E^{1\%}_{1\,см}$ для стандартного образца β-ионона;

100 — пересчет в %.

АЛЬДЕГИД C_{14}

(9-метил-7) 1, 1,5-триметилциклогексан-5-ил (-бутан-8-аль).

$C_{14}H_{22}O$

М. вес 206,37

Светло-желтая маслянистая жидкость. Т. кип. 50—55° при 10^{-3} мм, n_D^{20}—1,5113—1,5117. Хорошо растворяется в органических растворителях, плохо—в воде. На воздухе быстро разлагается, поэтому его хранят на холоду в ампулах, запаянных под азотом.

ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТРАЛЯ, φ-, β-, α-ИОНОНА И АЛЬДЕГИДА C_{14}

В Пражском институте фармации и биохимии разработаны и широко используются полярографические методы в контроле производства синтетического витамина А [Кноблох (Knobloch, 1956)].

В основу описанной ниже методики, используемой в нашей лаборатории, положена инструкция Пражского института биохимии и фармации с изменениями и дополнениями, предложенными В. И. Колтуновой.

Определение цитраля и псевдоионона. Полярографические кривые цитраля и псевдоионона снимают на фоне 0,5 н. HCl в среде 45% этанола и по высоте волн сравнивают со стандартными препаратами по калибровочным

графикам (рис 12). Потенциал восстановления в этих условиях при измерении с насыщенным каломельным электродом для цитраля равен—0,9 в, для псевдоионона—0,73 в.

Построение калибровочного графика. В мерной колбе емкостью 25 мл взвешивают 50 мг стандартного препа-

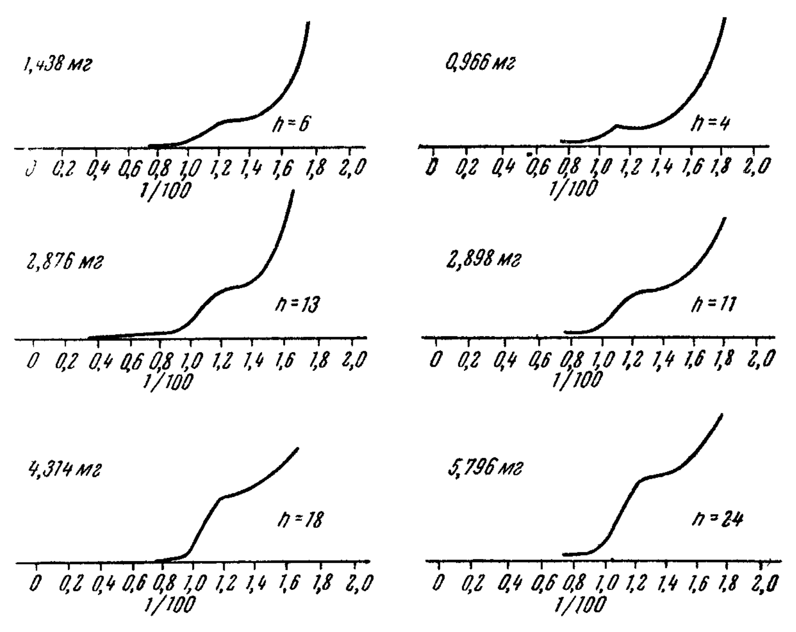


Рис 12 Полярографические кривые стандартных растворов β-ионона

рата, растворяют в 96% этиловом спирте, доводят им до метки и тщательно перемешивают.

Из полученного раствора отбирают количество миллилитров, соответствующее 1, 2, 3, 4, 5, 6 мг препарата, и доводят объем каждого из них до 10 мл этиловым 96% спиртом, добавляют по 10 мл 0,5 н раствора HCl и перемешивают. Полученные растворы поочередно помещают в ячейку полярографа, в течение 5 минут пропускают ток азота и затем производят съемку полярографической кривой, начиная с —0,6 в для цитраля и с —0,4 в для псевдоионона Высоту волн наносят на график

по оси ординат соответственно взятой концентрации, отложенной по оси абсцисс.

Определение. Точную навеску вещества в количестве от 50 до 100 мг помещают в мерную колбу емкостью 25 мл, растворяют в 96% этиловом спирте и доводят спиртом до метки. Для определения отбирают количество раствора, соответствующее содержанию в нем 2—4 мг препарата, доводят объем этиловым спиртом до 10 мл и затем добавляют 10 мл 0,5 н. раствора HCl. Снимают кривую, как описано выше.

Оценку производят сравнением со стандартным препаратом по калибровочному графику.

Расчет процентного содержания (x) производят по формуле:

$$x = \frac{v \cdot C \cdot 100 \cdot v_2}{a \cdot v_1},$$

где v — объем, в котором растворена навеска, в мл;
C — количество вещества, найденное по калибровочному графику, в мг/мл;
v_1 — объем раствора, взятый на определение, в мл;
v_2 — общий объем раствора, взятый для полярографирования, в мл;
a — навеска в мг;
100 — пересчет в %.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ β-ИОНОНА, α-ИОНОНА И АЛЬДЕГИДА C_{14}

Полярографические кривые β-ионона, α-ионона и альдегида C_{14} снимают на фоне ацетатного буфера (pH=3) в среде 45% этилового спирта с добавлением 0,1% желатины; полученные кривые оценивают по соответствующим калибровочным графикам. Потенциал восстановления β-ионона в описанных условиях равен — 1,04 в, α-ионона — 1,22 в, альдегида C_{14}—1,2 в (по отношению к НКЭ).

Построение калибровочного графика. В мерной колбе емкостью 25 мл взвешивают 50 мг стандартного препарата, растворяют в этиловом спирте, доводят спиртом до метки и тщательно перемешивают. Для построения калибровочного графика отбирают количества раствора, соответствующие 1, 2, 3, 4, 5 мг препарата, и доводят объем каждого из них до 10 мл этиловым спиртом, добавляют по 1 мл 0,1% раствора желатины и по 9 мл ацетатного буферного раствора (pH = 3). Полученные растворы поочередно помещают в ячейку полярографа, пропускают в течение 5 минут ток азота и затем производят съемку полярографической кривой начиная с — 0,8 в для β-ионона и α-ионона и с — 1,0 в для альдегида C_{14}. Калибровочный график строят, откладывая по оси ординат высоты волн, а по оси абсцисс — концентрации (рис. 13).

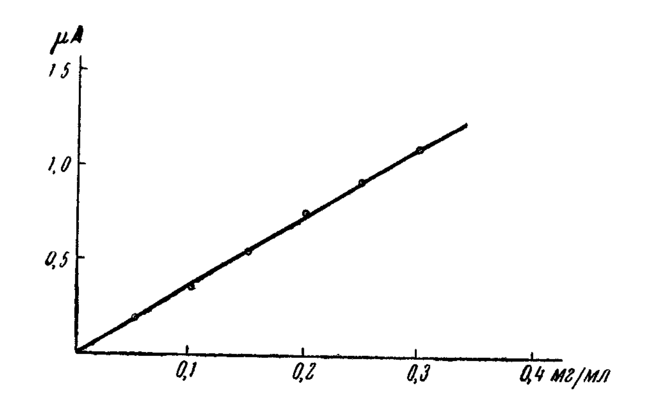


Рис 13. Калибровочный график для β-ионона на фоне ацетатного буфера pH=3.

Определение. Точную навеску вещества в количестве от 50 до 100 мг помещают в мерную колбу емкостью 25 мл, растворяют в этиловом спирте и доводят спиртом до метки. Для определения отбирают количество раствора, соответствующее содержанию в нем 2—4 мг препарата, доводят объем этиловым спиртом до 10 мл, добавляют 1 мл 0,1% раствора желатины, 9 мл ацетатного буферного раствора (pH=3) и снимают полярографическую кривую, как описано выше.

Оценку производят сравнением со стандартным препаратом по калибровочному графику. Расчет процентного содержания вещества (x) производят по формуле, изложенной выше.

АКСЕРОФТОЛ (ВИТАМИН А)

Витамин А является ненасыщенным алкоголем. С жирными кислотами образует эфиры (пальмитат, стеарат и др.). Дает цветные реакции с растворами треххлористой сурьмы, треххлористого мышьяка, с дихлоргидрином глицерина. При пропускании через колонку с асканитом, бентонитом и другими кислыми глинами адсорбируется с образованием синей окраски. В природе встречается в виде витамина A_1, A_2, A_3 как в свободном, так и в этерифицированном состоянии, а также в виде cis- и trans-изомеров. Промышленными препаратами являются синтетический витамин А — ацетат в кристаллическом виде и в масляных растворах и препараты из естественного сырья — концентраты витамина А, получаемые путем молекулярной дистилляции печеночных жиров рыб и морского зверя, выпускаемые в виде растворов, а также в драже и таблетках.

Строение витамина А:

Витамин А — алкоголь

Витамин А — ацетат

За последние годы широкое распространение получили водно-дисперсные препараты витамина А, усвоение которых организмом превосходит жирорастворимые препараты. С этой точки зрения они представляют определенный интерес, чем и объясняется необходимость их широкого промышленного выпуска. Кроме того, водорастворимые препараты витамина А обладают хорошей устойчивостью при хранении, а методы их анализа предусматривают омыление навески, экстракцию неомыляемых и определение оптической плотности растворов или по ре-

Физико-химические свойства

Показатели	Витамин А — алкоголь	Витамин А — ацетат
Состояние вещества	Бледно-желтые иглы	Бледно-желтые иглы
Формула	$C_{20}H_{30}O$	$C_{22}H_{32}O_2$
Молекулярный вес	286,4	328,48
Температура плавления	63—64°	53—57° (в пределах 2°)[1]
Растворимость	Растворяется в большинстве органических растворителей; не растворяется в воде	
Биологическая активность	1 г=3 330 000 ИЕ	1 г=2 879 580 ИЕ
$E^{1\%}_{1\,см}$ 326 (этанол)	1830[2]	1550[2]
$E^{1\%}_{1\,см}$ 620 (для реакций с треххлористой сурьмой)	4400	
Флуоресценция	Зеленая в ультрафиолетовом свете	
Фактор пересчета	2000[3]	
Стандарт	1 ИЕ=0,3 γ витамина А	1 ИЕ=0,344 γ витамина А—ацетата

[1] По другим данным, 60, 4° (Boldingh. Nature, 1951, 168, 598), 57—58° (Sebrell, Harris Vitamins, 1954, 1).

[2] По данным Boldingh, $E^{1\%}_{1см}$ при 325 mμ соответственно 1830 и 1561.

[3] Принят во ВНИВИ; также 1894 (USP Reference Standard) и 2000 (AOAC, 1947).

акции с хлоридом сурьмы, или измерением поглощения света на спектрофотометре, как это описано ниже.

Методы определения витамина А основаны либо на реакции его с хлороформным раствором $SbCl_3$, либо на измерении поглощения ультрафиолетовой части спектра спиртовых или хлороформных растворов витамина. Принципиально эти два метода дают совпадающие между собой результаты при условии применения соответ-

ствующего коэффициента перевода экстинкции на биологическую активность в ИЕ (фактор конверсии). Во ВНИВИ этот коэффициент принят равным 2000, что совпадает с рекомендацией Ассоциации американских химиков (1947).

Принцип колориметрического определения витамина А заключается в том, что подлежащий исследоваиию концентрат витамина А растворяют в хлороформе (высококонцентрированные препараты омылению не подвергают), с хлороформным раствором проводят реакцию с треххлористой сурьмой в присутствии уксусного ангидрида, образующуюся синюю окраску ввиду ее неустойчивости немедленно измеряют с помощью электрофотоколориметра, пользуясь при этом светофильтром $\lambda=620$ mμ. Калибровочный график составляется по кристаллическому витамину А—ацетату. Пользуясь калибровочным графиком, определяют содержание витамина в испытуемом растворе.

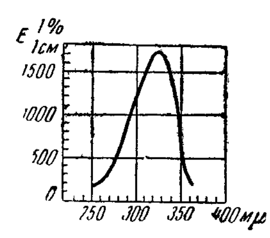


Рис. 14. Абсорбционная кривая витамина А — ацетата.

Спектрофотометрический метод основан на свойстве витамина А поглощать часть света в ультрафиолетовой части спектра; на длине волны 325—328 mμ находится максимум этого поглощения (рис. 14). Сопоставляя величину экстинкции для испытуемого раствора с величиной экстинкции стандартного раствора (или пользуясь для этого заранее составленной абсорбционной кривой), рассчитывают обычным путем содержание витамина А в испытуемом растворе.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ВИТАМИНЕ А — АЦЕТАТЕ

0,05 г препарата (точная навеска) растворяют в этиловом спирте в мерной колбе емкостью 100 мл (при необходимости можно слегка нагреть на водяной бане при 40—50°). Содержимое колбы охлаждают до 20° и доводят спиртом до метки. Из полученного раствора отбирают 1 мл, переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, раствор доводят спиртом до метки и перемешивают. Из этого раствора отбирают 1 мл и переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, доводят спиртом до метки, перемешивают и измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при $\lambda=326$ mμ в кювете с толщиной слоя 1 см.

Содержание витамина А—ацетата в препарате в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{D \cdot v_1 \cdot v_2 \cdot v_3 \cdot 100}{a \cdot B_1 \cdot B_2 \cdot 1550},$$

где a — навеска в г;
D — оптическая плотность раствора;
v_1 — объем первого разведения в мл (100);
B_1 — количество первого раствора, взятое для второго разведения, в мл;
v_2 — объем второго разведения в мл (25);
B_2 — количество второго раствора, взятое для третьего разведения, в мл;
v_3 — объем третьего разведения в мл (25);
1550 — $E^{1\%}_{1см}$ удельный показатель поглощения для 100% витамина А — ацетата при 326 mμ.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А — АЦЕТАТА В МАСЛЯНЫХ РАСТВОРАХ

Определение может быть проведено одним из следующих методов.

Спектрофотометрический метод

0,1 г масляного препарата (точная навеска) растворяют в абс. этаноле в мерной колбе емкостью 100 мл, доводят им до метки и перемешивают. Полученный раствор разводят абс. этанолом до получения растворов, содержащих около 4 ИЕ витамина А в 1 мл. Измеряют оптическую плотность растворов на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 326 mμ.

Содержание витамина А — ацетата в ИЕ в 1 г (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{D \cdot v_1 \cdot v_2 \cdot 1880}{a \cdot 100 \cdot v},$$

4 В. А. Девятнин

где D — оптическая плотность раствора;
v, v_1 и v_2 — разведения в мл;
a — навеска в г;
1880 — коэффициент перевода в ИЕ.

Колориметрический метод

0,1 г препарата (точная навеска) омыляют 10 мл 0,5 н. спиртового раствора едкого кали в колбе с обратным хлодильником при нагревании на водяной бане при 80° в течение 30 минут[1]. Добавляют 20 мл воды и экстрагируют неомыляемую фракцию серным эфиром в делительной воронке в хорошо охлажденном растворе при осторожном перемешивании во избежание образования эмульсии 1 раз 50 мл и 2 раза по 25 мл. Соединенные эфирные вытяжки промывают 3—4 раза водой по 20 мл до отсутствия реакции на фенолфталеин, в промытую эфирную вытяжку добавляют 6—8 г безводного сульфата натрия. Оставляют на 30 минут при периодическом взбалтывании и фильтруют. Фильтр промывают эфиром, собирая эфир в ту же колбу, эфир отгоняют в атмосфере инертного газа. Остаток растворяют в хлороформе, количественно переносят в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят им до метки. Полученный раствор разводят хлороформом до содержания 5—10 ИЕ витамина А в 1 мл. Затем 0,6 мл последнего раствора переносят в кювету электрофотоколориметра, добавляют 2—3 капли уксусного ангидрида, 6 мл насыщенного хлороформного раствора треххлористой сурьмы и измеряют оптическую плотность, пользуясь красным светофильтром (620 mμ), не позднее чем через 5—10 секунд после добавления последнего реактива.

По калибровочному графику находят содержание витамина А в ИЕ в 0,6 мл раствора, взятого на определение.

Содержание витамина А в ИЕ (x) в 1 г препарата вычисляют по формуле:

$$x = \frac{b \cdot v_1 \cdot v_2}{a \cdot 0,6},$$

[1] Для стабилизации витамина А можно добавлять небольшое количество (30—50 мг) пирогаллола.

где b — количество витамина А, найденное по калибровочному графику, в ИЕ;
v_1 и v_2 — разведения (первое и второе) в мл;
a — навеска в г;
0,6 — количество испытуемого раствора, взятое на реакцию, в мл.

Построение калибровочного графика. Точную навеску кристаллического витамина А—ацетата, или масляного концентрата, содержащего не менее 100 000 ИЕ в 1 мл, растворяют в мерной колбе в хлороформе с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора содержалось 100 ИЕ. Из этого раствора готовят 5 последовательных разведений с таким расчетом, чтобы в 0,6 мл содержалось 2, 4, 6, 8 и 10 ИЕ. Из каждого разведения отбирают по 0,6 мл раствора, добавляют 2—3 капли уксусного ангидрида и 6 мл треххлористой сурьмы. Интенсивность образовавшейся окраски измеряют не позднее чем через 5—10 секунд после прибавления последнего реактива, используя красный светофильтр ($\lambda = 620$ mμ). Для построения графика на оси абсцисс откладывают содержание витамина А в ИЕ или в гаммах, а на оси ординат—соответствующие плотности. Полученные точки соединяют; правильно построенный график в указанных пределах должен иметь вид прямой линии.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ АНАЛИЗЫ

Витамин А, полученный синтетическим путем, подлежит растворению в масле. Для установления пригодности масла для растворения в нем витамина А существует метод, основанный на определении перекисей, возникающих после кратковременной обработки масла в тонком слое при высокой температуре. Быстрое возникновение перекисей, определяемых йодометрическим путем, указывает на неустойчивость масла и непригодность его для получения масляных растворов витамина А, тогда как стойкое при хранении масло в этих условиях покажет лишь незначительное количество перекисей. Этот способ предложен О. К. Палладиной (1954) в Институте жировой промышленности и нашел применение в практике контроля витаминного производства.

Определение числа индукционного периода масла

1 мл испытуемого масла помещают в чашку Петри и оставляют на 15 минут в термостате при 150°. По прошествии указанного времени содержимое чашки смывают в коническую колбу с притертой пробкой с помощью 15 мл хлороформа. В колбу добавляют 15 мл концентрированной (80%) уксусной кислоты и 1 мл насыщенного водного раствора йодистого калия. Колбу закрывают пробкой, содержимое ее взбалтывают и оставляют на 20 минут в темноте. По истечении указанного времени в колбу добавляют 1 мл свежеприготовленного 1% раствора крахмала, 70 мл дистиллированной воды и содержимое колбы быстро оттитровывают 0,002 н. раствором $Na_2S_2O_3$. Одновременно ставят контрольный опыт без прогревания.

Разница в титровании испытуемой и контрольной проб не должна составлять более 2 мл 0,002 н. раствора $Na_2S_2O_3$. В противном случае масло не может быть рекомендовано для использования в качестве растворителя витамина А ввиду его недостаточной стойкости при последующем хранении с растворенным в нем витамином А.

Расчет числа индукционного периода масла в миллилитрах 0,002 н. раствора $Na_2S_2O_3$ (x) производят по формуле:

$$x = a - b,$$

где a — количество 0,002 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшее на титрование опытной пробы, в мл;

b — количество 0,002 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшее на титрование контрольной пробы, в мл.

ПОДГОТОВКА К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ВИТАМИНА А В ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Определение производят одним из описанных методов. Подготовка образцов для колориметрирования заключается в следующем.

Жиры рыб и млекопитающих. 0,5—1 г жира омыляют 10 мл 0,5 н. спиртового раствора едкого кали и далее поступают, как указано раньше.

Концентраты витамина А. 0,2—0,5 г концентрата омыляют 15 мл 0,5 н. едкого кали и далее поступают, как было описано выше. Концентраты, содержащие свыше 50 000 ИЕ витамина А в 1 мл, анализируют следующим образом: 0,2 г концентрата растворяют в хлороформе в мерной колбе емкостью 25 мл. Из полученного раствора отбирают от 1 до 10 мл и производят второе разведение в мерной колбе емкостью 25 мл. Полученный раствор поступает на реакцию с $SbCl_3$.

Сливочное и топленое масло, маргарин, комбижир. 10—20 г жира омыляют 20—40 мл 20% спиртового раствора едкого кали в течение 1—2 часов на водяной бане при 85—90°. К охлажденному раствору прибавляют двукратный объем воды и экстрагируют неомыляемую фракцию эфиром один раз 75 мл и два раза по 25 мл. Далее поступают, как было описано выше.

Молоко. 100—200 мл молока смешивают с $^1/_{10}$ объема водного 60% раствора едкого кали и 20—40 мл этилового спирта и оставляют на 48 часов в темноте при 20—25°, время от времени помешивая. Экстракцию неомыляемой фракции производят серным эфиром 4 раза: один раз — 75 мл, последующие разы — по 30—40 мл. Далее поступают, как указано.

Печень и другие органы животных. К 3 г печени добавляют 1 мл 60% водного раствора едкого кали и 10—20 мл этилового спирта. Омыление производят на водяной бане при 85—90° в течение 2—4 часов. Дальнейший ход анализа описан выше.

Яйца. К 20 г яичного желтка добавляют 6 мл 60% водного раствора едкого кали и 10—20 мл этилового спирта. Омыление ведут на водяной бане при 85—90° в течение не менее 2 часов. Дальнейший ход анализа описан выше.

Драже и таблетки с витамином А. К 1—2 г драже или таблеток добавляют около 1 г сульфата натрия, растирают, для спектрофотометрического определения витамин А экстрагируют этиловым спиртом, а для колориметрирования — хлороформом.

Витаминизированные кондитерские изделия. Навеску 20—50 г экстрагируют 2—3 раза эфиром холодным способом, затрачивая на каждую экстракцию по 20 мл эфира. Эфирные вытяжки фильтруют,

эфир удаляют в токе инертного газа. Остаток после отгонки эфира растворяют в хлороформе и далее поступают, как описано (можно экстракцию производить хлороформом).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А В ПРОДУКТАХ, СОДЕРЖАЩИХ ВИТАМИН А И КАРОТИН

В продуктах, содержащих и витамин А, и каротин (коровье масло, яйца, молоко, печень и др.), ход анализа изменяется следующим образом. Высушенный эфирный экстракт неомыляемой фракции делят на две части: в одной части определяют витамин А (после отгонки эфира и растворения остатка в хлороформе), в другой — после отгонки эфира и растворения остатка в петролейном эфире определяют каротин.

За вычетом количества каротина, выраженного в синих единицах (см. метод определения каротина, стр. 313), из количества витамина А, полученного при этом определении, получают истинное содержание витамина А в продукте.

При спектрометрическом определении остаток после отгонки эфира растворяют в абсолютном этаноле.

Методы контроля в синтезе витамина B_1

ЭТИЛФОРМИАТ

Этиловый эфир муравьиной кислоты

$HCOOC_2H_5$ М. вес 74

Бесцвѐтная летучая жидкость с эфирным запахом. Уд. вес при 20°—0,9073. Т. кип. 54,5°. Легко растворим в спирте и эфире.

Методы определения качества этилформиата разрабатывались в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ В. М. Иосиковой, В. В. Зворыкиной и Е. Н. Чесалиной (1953) и в лаборатории Экспериментального завода ВНИВИ.

Определение процентного содержания основано на омылении этилформиата избытком титрованного раствора щелочи и определения с помощью титрованного раствора соляной кислоты количества щелочи, не вступившей в реакцию с эфиром (Торп и М. Уайтли, 1937).

1. $HCOOC_2H_5 + KOH\ (изб) \rightarrow HCOOK + C_2H_5OH + KOH$.
2. $KOH + HCl \rightarrow KCl + H_2O$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

В круглодонную колбу емкостью 200—250 мл, снабженную обратным холодильником, вносят 1,5 мл испытуемого раствора этилформиата, прибавляют 50 мл 0,5 н. раствора KOH, колбу закрывают пробкой с холодильни-

ком и содержимое ее нагревают в течение часа на кипящей водяной бане По охлаждении колбы внесенный в нее избыток щелочи оттитровывают 0,5 н раствором HCl в присутствии 2—3 капель фенолфталеина в качестве индикатора

Расчет процентного содержания этилформиата в растворе (x) производят по формуле·

$$x = \frac{(v - v_1)\ 0,03704 \cdot 100}{a \cdot d},$$

где v — количество точного 0,5 н раствора KOH, взятое для омыления, в мл;
v_1 — количество точного 0,5 н. раствора HCl, пошедшее на обратное титрование, в мл;
0,03704 — количество этилформиата, соответствующее 1 мл точного 0,5 н. раствора KOH, в г;
a — количество испытуемого раствора этилформиата, взятое на анализ, в мл;
d — удельный вес испытуемого раствора этилформиата (при 20°);
100 — пересчет в %.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСИ СВОБОДНОЙ МУРАВЬИНОЙ КИСЛОТЫ

Определение основано на титровании примеси свободной муравьиной кислоты раствором спиртовой щелочи (во избежание гидролиза эфира) и освобождении связанной кислоты:

$$(HCOOC_2H_5 + HCOOH) + KOH \rightarrow HCOOC_2H_5 + HCOOK + H_2O.$$

10 мл испытуемого этилформиата помещают в эрленмейеровскую колбу емкостью 50 мл, добавляют 5 капель метилового красного в качестве индикатора и титруют 0,1 н. спиртовым раствором KOH из микробюретки до появления желтого окрашивания.

Содержание свободной муравьиной кислоты в испытуемом образце (x) вычисляют по формуле·

$$x = \frac{v \cdot 0,0046 \cdot 100}{a\ d},$$

где v — количество точного 0,1 н. спиртового раствора KOH, пошедшее на титрование, в мл;
a — количество испытуемого этилформиата, взятое на анализ, в мл;
0,0046 — количество муравьиной кислоты, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора KOH, в г;
d — удельный вес этилформиата (при 20°);
100 — пересчет в %.

Примечания 1 При отсутствии микробюретки титрование производят с помощью 0,01 н спиртового раствора KOH из макробюретки При расчете пользуются следующей формулой

$$x = \frac{v\ 0,00046\ 100}{a \cdot d}.$$

2 Титрование можно также производить с помощью 0,1 н раствора этилата натрия, что уменьшает возможность гидролиза препарата

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛАГИ В ЭТИЛФОРМИАТЕ[1]

Смешивают в пробирке 0,5 мл этилформиата с 8,5 мл бензина (т. кип. до 100°). Появление мути свидетельствует о наличии более 0,5% влаги в продукте.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПИРТА В ЭТИЛФОРМИАТЕ[1]

В цилиндр емкостью 100 мл с притертой пробкой вносят 50 мл этилформиата и 50 мл насыщенного раствора NaCl или $CaCl_2$ Смесь взбалтывают в течение 3 минут, оставляют для расслаивания и по делениям цилиндра отсчитывают увеличение объема солевого раствора Увеличение объема, умноженное на 2, соответствует процентному содержанию спирта при условии отсутствия в образце влаги. Если проба этилформиата была влажной, то указанное увеличение объема равно сумме спирта и влаги. Вычитая из 100 полученное процентное содержание спирта, можно судить о качестве этилформиата в ходе технологического процесса.

[1] Разработано Н Я Волковой в лаборатории Экспериментального завода ВНИВИ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУРАВЬИНОЙ КИСЛОТЫ В КУБОВЫХ ОСТАТКАХ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЭТИЛФОРМИАТА

(по прописи Н. Я. Волковой, Экспериментальный завод ВНИВИ)

Навеску этилформиата в количестве 1 г, взятую на аналитических весах, растворяют в 40 мл 50% этилового спирта и титруют нормальным раствором NaOH в присутствии метилового оранжевого до появления соломенно-желтого окрашивания (определяется серная кислота), затем добавляют 4—5 капель фенолфталеина и титруют нормальным раствором NaOH до появления розового окрашивания.

Расчет количества непрореагировавшей муравьиной кислоты в процентах (x) производят по формуле:

$$x = \frac{0,046 \cdot (v - v_1) \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного н. раствора NaOH, пошедшее на первое и второе титрование, в мл;

v_1 — количество точного н. раствора NaOH, пошедшее на первое титрование, в мл;

0,046 — количество муравьиной кислоты, соответствующее 1 мл точного н. раствора NaOH, в г;

a — навеска в г;

100 — пересчет в %.

ЭТИЛАТ НАТРИЯ

C_2H_5ONa М. вес 68,05

Гигроскопический порошок. Растворим в спирте. В воде разлагается:

$$C_2H_5ONa + H_2O \rightarrow C_2H_5OH + NaOH.$$

Методы определения качества этилата натрия разработаны в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ В. М. Иосиковой, В. В. Зворыкиной и Е. Н. Чесалиной (1953). Поскольку в препарате могут быть примеси этилового спирта (недостаточно высушенный продукт), а также едкого натра (как продукт гидролиза), в оценке препарата предусматривается также определение этих примесей.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

В основе метода лежит реакция окисления молекулы спирта до уксусной кислоты бихроматом калия, предложенная Никлу (Nicloux, 1906).

1. $2K_2Cr_2O_7 + 8H_2SO_4 \rightarrow 4KCr(SO_4)_2 + 8H_2O + 3O_2$.
2. $3C_2H_5OH + 3O_2 \rightarrow 3CH_3COOH + 3H_2O$.

Навеску этилата натрия в количестве 2—5 г помещают в высушенный вместе с кусочком гигроскопической ваты и взвешенный высокий узкий бюкс, прикрывают ее в бюксе ватой, высушивают в вакуум-эксикаторе над серной кислотой в течение 12—18 часов и снова взвешивают.

По разности весов до высушивания и после него узнают количество свободного спирта и пересчитывают на процентное содержание.

Из высушенного, как указано, продукта отбирают навеску в количестве 0,2—0,3 г в мерную колбу емкостью 100 мл, растворяют в дистиллированной воде и раствор доводят водой до метки.

В эрленмейеровскую колбу емкостью 25—30 мл отбирают пипеткой 5 мл полученного раствора, добавляют 1 каплю раствора двухромовокислого калия, 5 мл концентрированной H_2SO_4 (уд. вес 1,84), колбу помещают на электроплитку и содержимое ее титруют из микробюретки раствором двухромовокислого калия при постоянном нагревании колбы (не доводя, однако, ее содержимое до кипения во избежание потерь спирта) до перехода голубой окраски раствора в зеленую.

Для облегчения улавливания конца титрования следует иметь цветной эталонный раствор, который готовится следующим образом: 0,1 мл абсолютного этилового спирта (уд. вес 0,791) доводят водой в мерной колбе до 100 мл. Из полученного раствора отбирают 5 мл в эрленмейеровскую колбу емкостью 25—30 мл, туда же добавляют 1 каплю двухромовокислого калия. Полученный зеленого цвета раствор является эталоном сравнения.

Расчет процентного содержания этилата натрия в испытуемом препарате (x) производят по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0,791 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 66,19 \cdot 5},$$

где v — количество раствора $K_2Cr_2O_7$, пошедшее на титрование, в мл;
0,791 — уд. вес абсолютного этилового спирта;
66,19 — процентное содержание C_2H_5OH в C_2H_5ONa;
5 — количество испытуемого раствора, взятое на титрование, в мл;
100 — разведение в мл;
a — навеска в г.

В сокращенном виде формула приобретает следующее выражение:

$$x = \frac{v \cdot 23,9}{a}.$$

Определение этилата натрия реактивом Фишера

Этилат натрия в безводной среде не реагирует с системой $J_2 + SO_2$ в смеси пиридина и метанола, а $NaOH$ и Na_2CO_3 с этим реактивом вступают в реакцию по уравнению:

$$NaOH + HJ \rightarrow NaJ + H_2O.$$
$$Na_2CO_3 + 2HJ \rightarrow 2NaJ + H_2O.$$
$$H_2O + SO_2 + J_2 \rightarrow 2HJ + SO_3.$$

Титрованием испытуемого раствора серной или соляной кислотой определяют общее количество натрия ($C_2H_5ONa + NaOH + Na_2CO_3$), а при помощи реактива Фишера — количество $NaOH$ или Na_2CO_3. По разности между титрованиями вычисляют содержание этилата натрия[1].

Определение содержания едкого натра в пересчете на натрий

К навеске спиртового раствора этилата натрия в количестве 0,5—0,6 г, помещенной в коническую колбу с притертой пробкой, добавляют 5 мл безводного этилового спирта, раствор титруют реактивом Фишера до появления бурого окрашивания. Отдельно титруют 5 мл безводного этилового спирта как контрольный опыт.

[1] ВТУ 29-53 «Этилат натрия в спиртовом растворе» МППТ СССР. Разработаны Е. Н. Новиковой и Л. Н. Петровой в Институте парфюмерной промышленности

Вычисление процентного содержания едкого натра в пересчете на натрий в испытуемом образце (x) производят по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot m \cdot 23 \cdot 100}{a \cdot 18},$$

где v — количество реактива Фишера, пошедшее на титрование навески, в мл;
v_1 — количество реактива Фишера, пошедшее на титрование спирта, в мл;
m — титр реактива Фишера, выраженный в граммах H_2O;
23 — атомный вес натрия;
100 — пересчет в %;
a — навеска в г;
18 — молекулярный вес H_2O.

Определение общего количества натрия

Навеску этилата натрия в количестве около 0,5 г растворяют в 15—20 мл воды и титруют 0,5 н. раствором H_2SO_4 в присутствии нескольких капель метилового оранжевого. Конец реакции проверяют потенциометрически.

Содержание общего количества натрия в процентах в испытуемом образце (x_1) вычисляют по формуле:

$$x_1 = \frac{v \cdot 23 \cdot 100}{a \cdot 2 \cdot 1000},$$

где: v — количество точного 0,5 н. раствора H_2SO_4, пошедшее на титрование, в мл;
23 — атомный вес натрия;
100 — пересчет в %;
a — навеска в г;
2 — коэффициент пересчета на нормальный раствор;
1000 — пересчет на мл.

При сокращении формула приобретает значение:

$$x_1 = \frac{v \cdot 1,15}{a}.$$

Расчет процентного содержания этилата натрия в спиртовом растворе (x_2) производят по формуле:

$$x_2 = \frac{(x_1 - x) \cdot 68,05}{23},$$

где 68,05 — м. вес этилата натрия;
23 — ат. вес натрия.

Расчет содержания натрия, связанного в этилат натрия (x_3), по отношению к общему количеству натрия производят по формуле:

$$x_3 = \frac{(x_1 - x) \cdot 100}{x}.$$

Примечание. Методы, основанные на титровании этилата натрия реактивом Фишера, имеют преимущество в смысле быстроты выполнения

АКРИЛОНИТРИЛ

Нитрил акриловой кислоты

$CH_2 = CHCN$ М. вес 53,06

Бесцветная или окрашенная легко подвижная жидкость, обладающая своеобразным запахом. Уд. вес 0,806—0,809 (при 20°). Пределы кипения в интервале 72—80°; коэффициент рефракции 1,390—1,392.

Методы анализа качества акрилонитрила описаны в ВТУ МХП 1926-49.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕДЕЛОВ КИПЕНИЯ

Перегонку ведут из круглодонной колбы тугоплавкого стекла емкостью 150 мл. Колба имеет следующие размеры: внутренний диаметр шара 65—67 мм, высота горла 25 мм. Горло колбы соединяют при помощи шлифа с дефлегматором диаметром 14 мм и высотой 150 мм. Дефлегматор имеет посередине шарик диаметром 30 мм, под которым на расстоянии 10 мм припаяна отводная трубка с внутренним диаметром 8 мм, длиной 120 мм.

Для охлаждения применяют холодильник Либиха, внутренняя трубка которого имеет длину 800 мм и диаметр 12 мм. Холодильник устанавливается таким образом, чтобы конец его внутренней трубки был на 100 мм ниже его начала. Дефлегматор соединяют с холодильником при помощи плотной корковой пробки. Горелку окружают железным кожухом высотой 250 мм и диаметром 130 мм с дверкой для горелки На расстоянии 10 мм от верхнего и нижнего края кожуха имеется 4 круглых отверстия для циркуляции продуктов горения.

Кожух в верхней части прикрывают асбестовым картоном толщиной 3—5 мм, имеющим вырез диаметром 50 мм, на который устанавливают перегонную колбу. С помощью мерного цилиндра (градуированного через 1 мл) емкостью 100 мл отбирают для анализа 100 мл испытуемого продукта (при 20°) в сухую, предварительно взвешенную с точностью до 0,01 г перегонную колбу. Отсчет температуры производят по термометру Аншютца с делениями на 0,5°.

Термометр укрепляют так, чтобы центр ртутного резервуара находился в центре расширения дефлегматора. Цилиндр, взятый для отмеривания акрилонитрила, используют в качестве приемника конденсата, закрывают крышкой из картона и устанавливают его в стакан с водой для охлаждения конденсата (20±2°). Скорость перегонки регулируют таким образом, чтобы в 1 минуту перегонялось 4—5 мл акрилонитрила. За начальную температуру кипения принимают наблюдаемую при падении первой капли жидкости из холодильника. За конечную температуру принимают максимальную, наблюдаемую во время перегонки, но не выше 80°.

Остаток в колбе охлаждают, взвешивают и рассчитывают по формуле.

$$\% \text{ остатка} = \frac{a - b}{d},$$

где a — вес колбы с остатком в г;
b — вес колбы в г;
d — удельный вес акрилонитрила (при 20°).

К отсчету температур, наблюдаемых при перегонке, прибавляют поправку (Δ_t), вычисленную по формуле:

$$\Delta_t = 0{,}042(760 - P),$$

где P — фактическое барометрическое давление в мм рт. ст.

Примечание При давлении ниже 760 мм поправка прибавляется, при давлении выше 760 мм — вычитается.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

Метод основан на отщеплении циан-группы, разложении ее щелочью и отгонке образующегося аммиака в титрованный раствор H_2SO_4. По количеству свободной

H_2SO_4 судят о количестве аммиака, связанного серной кислотой.

В колбу *Б* (рис. 15) вносят из бюретки 25 мл 0,5 н. раствора H_2SO_4 и в нее опускают аллонж форштосса холодильника *Е*. В реакционную колбу *А* вносят 50 мл 0,12% раствора метилалкоголята натрия в метиловом спирте и туда же вводят стеклянную ампулу с точной навеской (0,5—0,6 г) акрилонитрила. Колбу *А* быстро присоединяют к холодильнику *Г*, соединенному при помощи насадки Кьельдаля *Д* с холодильником *Е*. Содержимое колбы *А* нагревают в течение 30 минут с таким расчетом, чтобы жидкость в колбе кипела и пары спирта конденсировались в первом шарике холодильника *Г*. Затем в колбу *А* из капельной воронки *В* прибавляют 25 мл 40% раствора КОН (удельный вес 1,40) и 200 мл воды и вновь кипятят содержимое колбы в течение 75 минут. Из муфты холодильника *Г* сливают воду и, не прекращая нагревания колбы *А*, отгоняют из нее аммиак с 100—150 мл воды в колбу *Б*.

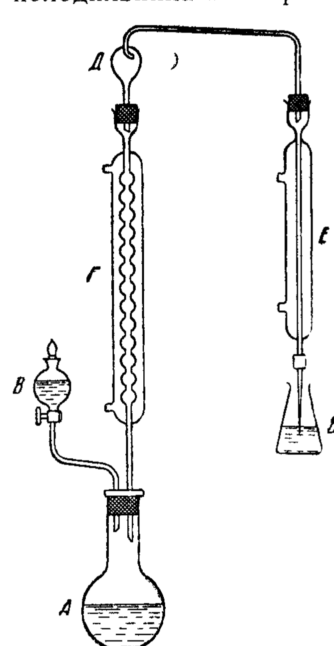


Рис 15. Прибор для аналнза акрилонитрила.

А — реакционная колба; *Б* — колба Эрленмейера; *В* — капельная воронка; *Г*, *Е* — холодильники, *Д* — насадка Кьельдаля

По окончании отгонки аммиака, не прекращая нагревания колбы *А*, колбу *Б* опускают таким образом, чтобы аллонж находился выше уровня жидкости, и продолжают отгонку еще около 10 минут, чтобы промыть аппаратуру.

По окончании отгонки содержимое колбы *Б* оттитровывают 0,5 н. раствором КОН или NaOH в присутствии нескольких капель метилового красного до появления желтого окрашивания раствора (продолжительность анализа 3—4 часа).

Расчет процентного содержания акрилонитрила в испытуемом продукте (x) производят по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1)\cdot 2{,}6503}{a},$$

где v — количество точного 0,5 н. раствора H_2SO_4, взятое в приемную колбу, в мл;
v_1 — количество точного 0,5 н. раствора щелочи, пошедшее на титрование, в мл;
2,6503 — постоянный коэффициент;
a — навеска акрилонитрила в г.

НАТРИЙ-α-ОКСИМЕТИЛЕН-β-ЭТОКСИПРОПИОНИТРИЛ (НАТРЭНОЛЯТ)

$$C_2H_5OCH_2 - \underset{\underset{CHONa}{\|}}{C} - CN$$

М. вес 149,129

Гигроскопический порошок кремоватого цвета. В воде разлагается.

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА

В химико-аналитической лаборатории ВНИВИ В. А. Девятниным, В. В. Никифоровой и И. А. Солуниной разработан колориметрический метод анализа натрий-α-оксиметилен-β-этоксипропионитрила, позволяющий определять его содержание в реакционной массе, включающей другие компоненты.

Метод основан на том, что некоторые энолы, взаимодействия с хлоридом железа, образуют окрашенные соли по типу:

$$\begin{array}{c} \quad OFeCl_2 \\ \quad | \\ H_3C - C = C\cdot COOC_2H_5 \\ \qquad\quad | \\ H_3C - C = C\cdot COOC_2H_5 \\ \quad | \\ \quad OFeCl_2 \end{array}$$

Этот комплекс имеет максимум поглощения при $\lambda = 470$ mμ и может быть количественно определен фотоколориметрическим путем.

Навеску энолята натрия в количестве 0,1—0,2 г с содержанием в ней 50—80 мг энолята растворяют в абсолютном этиловом спирте в мерной колбе емкостью 50 мл и объем раствора доводят спиртом до метки. Из полученного раствора отбирают пипеткой 0,5—1 мл (из расчета содержания 0,8—1 мг энолята натрия) в кювету электрофотоколориметра, добавляют туда же спирт до общего объема 6 мл и быстро приливают 1 мл 0,25% раствора хлорного железа в абсолютном спирте.

По истечении точно 10 секунд окраску раствора измеряют со светофильтром 470 mμ.

Расчет содержания энолята натрия в процентах (x) производят по формуле:

$$x = \frac{C \cdot 50}{a \cdot v \cdot 10},$$

где C — найденное по калибровочному графику количество энолята в мг;
50 — разведение в мл;
a — навеска в г;
v — количество раствора, взятое для реакции, в мл;
10 — постоянный коэффициент.

Составление калибровочного графика. Точную навеску химически чистого энолята натрия растворяют в абсолютном этиловом спирте в мерной колбе подходящего объема с таким расчетом, чтобы в 1 мл полученного раствора содержалось 0,7—0,75 мг энолята. Из полученного раствора последовательно отбирают пипеткой в кюветы электрофотоколориметра 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мл и в каждую кювету приливают соответственно 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5 мл абсолютного спирта (общий объем 6 мл). Затем последовательно в каждой кювете проводят реакцию, добавляя 1 мл 0,25% раствора хлорного железа в абсолютном спирте, как описано.

Окраску продукта реакции измеряют со светофильтром 470 mμ. Для установления прибора на нуль пользуются абсолютным спиртом. Полученные экстинкции показаний прибора откладывают на графике по оси ординат, а соответствующие им концентрации энолята в миллиграммах по оси абсцисс. Калибровочный график должен представлять прямую линию.

АЦЕТОНИТРИЛ

CH_3CN М. вес 41,05

Бесцветная подвижная жидкость. Уд. вес 0,783 (при 20°). Т. кип. 82°. Растворим в воде.

Методы определения качества продукта разработаны в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ В. М. Иосиковой, В. В. Зворыкиной и Е. Н. Чесалиной (1953) и основаны на определении азота в продукте. Однако технический продукт может содержать примесь аммиака, который необходимо удалить из продукта перед анализом.

КАЧЕСТВЕННОЕ ИСПЫТАНИЕ НА ПРИСУТСТВИЕ АММИАКА

В пробирку вносят 2 мл ацетонитрила, 2 мл воды и несколько капель 30—40% раствора щелочи, нагревают до кипения и по запаху определяют наличие аммиака.

В случае наличия аммиака ацетонитрил перегоняют на кипящей водяной бане, удаляя из приемника дистиллят, полученный при температуре ниже 79°, а фракцию, перегоняющуюся выше 79°, собирают, вновь проверяют на наличие аммиака и в случае его отсутствия используют для анализа.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

Пипеткой для взвешивания берут навеску ацетонитрила в количестве около 100 мг[1], переносят в кьельдалевскую колбу емкостью 50—100 мл, добавляют 3 мл х. ч. H_2SO_4, уд. вес 1,84, 2—3 капли 10% раствора $CuSO_4$ и сжигают в вытяжном шкафу до полного обесцвечивания содержимого (полученный раствор может иметь слабый голубой оттенок). Сжигание заканчивается в течение 60—70 минут.

После охлаждения к содержимому колбы осторожно, по стенке, добавляют 5—10 мл воды, содержимое колбы количественно переносят в круглодонную колбу для отгона, смывая из кьельдалевской колбы остатки жидкости

[1] Навеску можно заменить разведением следующим образом: в тарированную мерную колбу емкостью 50 или 100 мл вносят 0,5 или 1 мл ацетонитрила, взвешивают, доводят до метки 50% раствором H_2SO_4 и отбирают на сжигание 10 мл полученного раствора.

50 мл воды в 2—3 приема. Отгоночную колбу емкостью 150—200 мл снабжают резиновой пробкой с двумя отверстиями, в одно из которых вставлена капельная воронка с краном, в другое — каплеуловитель (насадка Кьельдаля). Каплеуловитель соединяют с холодильником, на форштосс которого надета трубка, погруженная в отмеренное в приемную коническую колбу количество (10 мл) 0,1 н. раствора H_2SO_4 (из бюретки) с одной каплей метилового оранжевого.

В капельную воронку наливают 15—20 мл 40% раствора NaOH, быстро спускают их в отгоночную колбу, быстро закрывают кран воронки, нагревают колбу и ведут перегонку ее содержимого до появления первых толчков в колбе.

Отгон аммиака заканчивается за 60—80 минут, после чего отъединяют каплеуловитель от холодильника, форштосс и трубку на конце холодильника обмывают небольшим количеством воды в приемную колбу и содержимое ее титруют 0,1 н. раствором NaOH до перехода розовой окраски в соломенно-желтую.

Содержание ацетонитрила в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1)\cdot 0{,}004105\cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора H_2SO_4, взятое в приемную колбу, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;
0,004105 — количество натрэнолята, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора H_2SO_4, в г;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

АЦЕТОИМИНОВЫЙ ЭФИР

$$CH_3-C\begin{matrix}\nearrow NH\cdot HCl\\ \searrow OC_2H_5\end{matrix}\qquad C_4H_{10}OClN$$

М. вес 123,589

Гигроскопические белые кристаллы, обладающие неприятным запахом. Растворим в воде, этиловом и метиловом спиртах.

Методы анализа эфира разработаны в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ В. М. Иосиковой, В. В. Зворыкиной и Е. Н. Чесалиной (1953) и основаны на определении его по хлору.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА ХЛОРА

Точную навеску эфира в количестве не более 2 г растворяют в воде в мерной колбе емкостью 100 мл, доводят водой до объема. Из полученного раствора отбирают 10 мл в коническую колбу, прибавляют 25 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$, 2 мл раствора железоаммониевых квасцов и титруют 0,1 н. раствором NH_4CNS или KCNS до появления бледно-розового окрашивания раствора.

Вычисление процентного содержания общего хлора в эфире (x) производят по формуле:

$$x = \frac{(25 - v)\cdot 0{,}003546\cdot 100}{a},$$

где 25 — количество точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, взятое в анализ, в мл;
v — количество точного 0,1 н. раствора роданата, пошедшее на обратное титрование, в мл;
0,003546 — количество эфира, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, в г;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСИ HCl (В ПЕРЕСЧЕТЕ НА Cl)

Точную навеску эфира в количестве 1 г растворяют в 20—25 мл воды и титруют 0,1 н. раствором NaOH в присутствии 2—3 капель метилового оранжевого до появления соломенно-желтого окрашивания.

Вычисление процентного содержания примеси хлора (x_1) производят по формуле:

$$x_1 = \frac{v\cdot 0{,}003546\cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;
0,003546 — количество хлора, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

Расчет процентного содержания (x_2) производят по формуле:

$$x_2 = \frac{(x - x_1)}{28,7} \cdot 100,$$

где 28,7 — содержание хлора в ацетоиминовом эфире в %;
x и x_1 — см. выше;
100 — пересчет в %.

АММИАК В СПИРТОВОМ РАСТВОРЕ

Метод анализа спиртового раствора аммиака основан на определении избытка серной кислоты, не вступившей в реакцию с аммиаком.

В коническую колбу емкостью 150—200 мл вносят 25 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4, туда же быстро вносят 0,5 мл испытуемого спиртового раствора аммиака, добавляют 2—3 капли метилового оранжевого и избыток серной кислоты оттитровывают 0,1 н. раствором NaOH до появления соломенно-желтого окрашивания.

Вычисление процентного содержания аммиака в растворе (x) производят по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0,001708 \cdot 100}{a \cdot d},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора H_2SO_4, взятое для связывания аммиака, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;
0,001708 — количество аммиака, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора H_2SO_4, в г;
a — количество испытуемого раствора, взятое на анализ, в мл;
d — удельный вес испытуемого раствора;
100 — пересчет в %.

АЦЕТАМИДИН ГИДРОХЛОРИД

$CH_3—C(=NH)NH_2HCl$ М. вес 94,55

Белый кристаллический продукт, хорошо растворимый в воде и спирте. Т. пл. 167°.

Методы анализа качества ацетамидина разработаны в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ В. М. Иосиковой, В. В. Зворыкиной и Е. Н. Чесалиной (1953).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА ХЛОРА

Точную навеску около 0,2 г (a) ацетамидина растворяют в 10 мл воды, прибавляют 25 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$ (v), 2 мл раствора железоаммониевых квасцов и титруют 0,1 н. раствором NH_4CNS или KCNS (v_1) до появления бледно-розового окрашивания раствора (расчет см. ниже).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСИ ХЛОРИСТОГО АММОНИЯ

В основу положен метод, опубликованный в VIII Госфармакопее СССР. Медгиз, 1946.

Метод основан на том, что в присутствии щелочи из хлористого аммония освобождается аммиак, обусловливающий превращение формальдегида в уротропин:

$$6HCHO + 4NH_4Cl + 4NaOH \rightarrow N_4(CH_2)_6 + 4NaCl + H_2O.$$

Точную навеску около 1 г ацетамидина растворяют в 30 мл воды, прибавляют 5 мл нейтрализованного формалина и титруют 0,1 н. раствором NaOH в присутствии 2—3 капель спиртового раствора фенолфталеина до появления розового окрашивания.

Расчет процентного содержания примеси NH_4Cl производят по формуле:

$$x = \frac{(v_2 - v_3) \cdot 0,00535 \cdot 100}{a_1},$$

где v_2 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование ацетамидина с формалином, в мл;
v_3 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование формалина, в мл;
a_1 — навеска ацетамидина в г;
0,00535 — количество хлористого аммония, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;
100 — пересчет в %.

Расчет процентного содержания ацетамидина в испытуемом препарате (x_1) производят по формуле:

$$x_1 = \left(\frac{v - v_1}{a} - \frac{v_2 - v_3}{a}\right) \cdot 0,009455 \cdot 100,$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, взятое для определения общего количества хлора, в мл;

v_1 — количество точного 0,1 н. раствора роданата, пошедшее на титрование, в мл;

a — навеска ацетамидина, взятая для определения общего количества хлора, в г;

0,009455 — количество ацетамидина, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, в г;

a_1 — см. выше;

100 — пересчет в %.

АМИНОПИРИМИДИН

(2-метил-4-аминопиримидин)

```
      N = CNH2
      |    |
H3C — C    C — CH2OC2H5
      ||   ||
      N — CH
```

М. вес 167,216

Белые или с кремоватым оттенком кристаллы, обладающие характерным (мышиным) запахом. Т. пл. 87°. Растворим в воде и органических растворителях.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ ПО АЗОТУ

(методы анализа разработаны в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ В. М. Иосиковой, В. В. Зворыкиной, Е. Н. Чесалиной)

Навеску аминопиримидина в количестве 0,05—0,07 г, взятую на аналитических весах, в маленькой пробирке переносят в кьельдалевскую колбу емкостью 50—100 мл, добавляют 3 мл концентрированной H_2SO_4 (уд. вес 1,84), несколько кристалликов $CuSO_4$ и содержимое колбы сжигают до полного обесцвечивания (что устанавливают только после полного охлаждения колбы).

Далее поступают, как указано в методе определения азота в ацетонитриле.

Содержание аминопиримидина в процентах (x) в испытуемом продукте вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0,0014 \cdot 167,216 \cdot 100}{a \cdot 42},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора H_2SO_4, взятое в приемную колбу, в мл;

v_1 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;

a — навеска в г;

0,0014 — количество азота, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора H_2SO_4, в г;

42 — грамм-эквивалент азота в аминопиримидине;

167,216 — м. вес аминопиримидина;

100 — пересчет в %.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Метод разработан в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ В. А. Девятниным и Г. А. Федоровой и основан на том, что 2-метил-4-аминопиримидин обладает свойством поглощать свет в ультрафиолетовой области спектра. Максимум абсорбции находится на длине волны $\lambda = 240\ m\mu$ (рис. 16). Измеряя величину экстинкции для раствора аминопиримидина известной концентрации, можно определить количество 2-метил-4-аминопиримидина, находящегося в растворе.

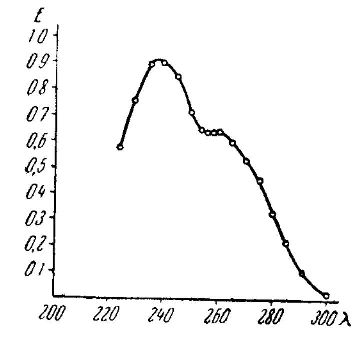


Рис. 16. Кривая абсорбции 2-метил-4-аминопиримидина.

Точную навеску испытуемого продукта в количестве 0,25 г помещают в мерную колбу емкостью 50 мл, растворяют в бидистиллированной воде (перегнанной из стекла) и доводят водой до

метки. После тщательного перемешивания содержимого колбы переносят 1 мл раствора в мерную колбу емкостью 200 мл и объем раствора доводят водой до метки. Полученный раствор поступает на измерение экстинкции. Измерение производят на длинах волн 225; 230; 235; 240; 245 mμ.

Содержание 2-метил-4-аминопиримидина в препарате в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{E_{\text{найд.}}}{E_{\text{станд.}}}.$$

Предварительно устанавливают описанным способом величину E для чистого 100% 2-метил-4-аминопиримидина.

Примечание. Для 2-метил-4-аминопиримидина 99,8% чистоты при описанной концентрации $E = 0{,}9$. В случае отсутствия стандарта высокой степени чистоты можно воспользоваться этим значением E и вычисление процентного содержания в испытуемом продукте производить по формуле:

$$x = \frac{E_{\text{найд.}} \cdot 99{,}8}{0{,}9} = E_{\text{найд.}} \cdot 110{,}9,$$

где 99,8 — процентное содержание стандартного образца;
0,9 — $E_{\text{станд.}}$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПО АЛКОКСИ-ГРУППЕ (ПО ФИБЕКУ И БРЕХЕРУ)

Точную навеску вещества в количестве 0,01—0,02 г, помещенную в колбу (*1*) (рис. 17), растворяют в 1 мл ледяной уксусной кислоты или в небольшом количестве фенола и прибавляют 1 мл йодисто-водородной кислоты (уд. вес 1,68—1,70). Предварительно осторожно так, чтобы капли растворов не попали в соединительные трубки (*2*), в промывалки (*3*) наливают по 0,5—1 мл 5% водного раствора сернокислого кадмия и 5% водного раствора тиосульфата натрия и закрывают их корковыми пробками.

В приемник (*4*) наливают 5 мл 10% раствора уксуснокислого натрия в ледяной уксусной кислоте и прибавляют несколько капель брома (уд. вес 3,14).

Для поглощения паров брома отверстие приемника прикрывают ватным тампоном, смоченным слабым раствором муравьиной кислоты.

Когда прибор готов для определения, на боковой отросток колбы (*1*) надевают каучуковую трубку, соединяющую прибор с газометром, наполненным N_2 или CO_2, и пропускают газ, регулируя его ток так, чтобы новый пузырек газа появлялся в растворе в тот момент, когда предыдущий достигнет поверхности. Затем начинают подогревать колбу (*1*) на маленьком пламени и доводят содержимое ее до кипения.

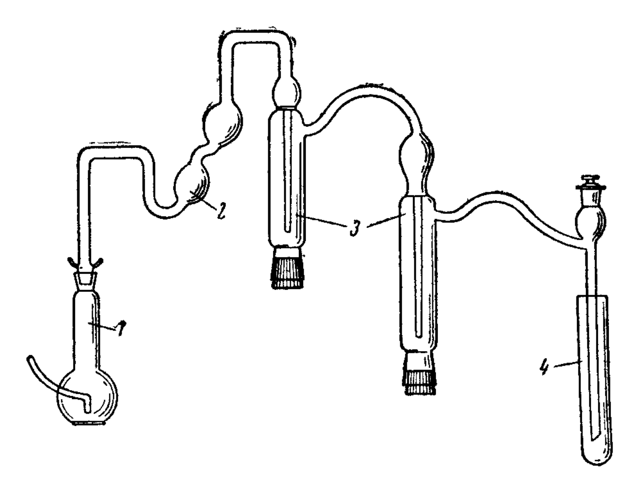


Рис. 17. Схема прибора для определения алкокси-групп (по Фибеку и Брехеру).
1 — реакционная колба; *2* — холодильник; *3* — промывалки; *4* — приемник.

Через 20—30 минут прекращают подогрев и содержимое приемника (*4*) переливают в эрленмейеровскую колбу емкостью 100 мл с притертой пробкой, в которой находится 1 г CH_3COONa в небольшом количестве воды, тщательно ополаскивая выводную трубку водой в ту же колбу.

В колбу добавляют по каплям муравьиную кислоту до обесцвечивания жидкости. При этом раствор сильно взбалтывают. В отсутствии брома убеждаются по исчезновению запаха.

Затем в колбу прибавляют несколько миллилитров разбавленной H_2SO_4 (1:10) и 5 мл 5% раствора KJ, взбалтывают и оставляют на 10—15 минут в темноте при комнатной температуре. Выделившийся йод титруют 0,02 н. раствором тиосульфата натрия в присутствии 1% раствора крахмала в качестве индикатора.

Расчет процентного содержания алкоксила (x) производят по формуле:

$$x = \frac{v \cdot b \cdot 100}{a \cdot 1000},$$

где v — количество точного 0,02 н. раствора тиосульфата натрия, пошедшее на титрование, в мл;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %;
b — 0,1034 мг CH_3O или 0,1501 мг C_2H_5O, соответствующее 1 мл точного 0,02 н. раствора $Na_2S_2O_3$.
1000 — пересчет в г

РАСТВОР БРОМА В УКСУСНОЙ КИСЛОТЕ

(методы анализа разработаны во ВНИВИ В. М. Иосиковой, В. В. Зворыкиной, Е. Н. Чесалиной)

В колбу емкостью 250 мл вносят 2 мл испытуемого раствора, добавляют 50 мл воды, 15 мл HNO_3 (разведенной водой в отношении 1:1), 25 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$; 0,5 мл раствора железоаммониевых квасцов в качестве индикатора и смесь титруют 0,1 н. раствором $KCNS$ или HN_4CNS до появления бледного розово-желтого окрашивания.

Расчет содержания HBr в граммах на 1 л в растворе (x) производят по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0{,}008092 \cdot 1000}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, взятое в анализ, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора роданата, пошедшее на титрование, в мл;
0,008092 — количество HBr, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, в г;

a — количество испытуемого раствора, взятое на анализ, в мл;
1000 — пересчет в г/л.

БРОМАМИНОПИРИМИДИН (БРОМГИДРАТ)

```
        N = C — NH2·HBr
        |   |
H3C — C     C — CH2Br
        ||  ||
        N — CH
```

М. вес 283

Кристаллическое вещество буроватого цвета. Т. пл. 209°. Растворим в воде и спирте. Нерастворим в большинстве органических растворителей. В кристаллическом виде и особенно в растворах легко изменяется.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПО АЗОТУ

(методы анализа разработаны во ВНИВИ В. М. Иосиковой, В. В. Зворыкиной, Е. Н. Чесалиной)

Навеску бромаминопиримидина в количестве 0,05—0,07 г, взятую на аналитических весах, в маленькой пробирке переносят в кьельдалевскую колбу емкостью 50—100 мл, добавляют 3 мл концентрированной H_2SO_4, несколько кристалликов $CuSO_4$ $5H_2O$, в горло колбы вставляют химическую воронку и содержимое колбы сжигают до полного обесцвечивания (что устанавливают после полного охлаждения колбы). Далее поступают, как описано ранее (стр. 67).

Содержание бромаминопиримидина в препарате в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0{,}0014 \cdot 283 \cdot 100}{a \cdot 42},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора H_2SO_4, взятое в приемную колбу, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора $NaOH$, пошедшее на титрование, в мл;
a — навеска в г;
0,0014 — количество азота, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора H_2SO_4, в г;

42 — грамм-эквивалент азота для бромаминопиримидина;
283 — м. вес бромаминопиримидина;
100 — пересчет в %.

При сокращении формула приобретает следующий вид:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0,9433}{a}.$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БРОМА

Навеску бромаминопиримидина в количестве 0,2—0,3 г, взятую на аналитических весах, помещают в колбу емкостью 250 мл, растворяют в 40—50 мл воды, прибавляют 15 мл разведенной (в отношении 1:1) HNO_3 25 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$, 0,5 мл раствора железоаммониевых квасцов и смесь титруют 0,1 н. раствором NH_4CNS или KCNS до появления бледно-розового окрашивания.

Расчет процентного содержания общего количества брома (x_1) производят по формуле:

$$x_1 = \frac{(v - v_1) \cdot 0,007992 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, взятое в анализ, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора роданата, пошедшее на титрование, в мл;
a — навеска в г;
0,007992 — количество брома, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$, в г;
100 — пересчет в %.

Определение примеси аминопиримидина в виде бром гидрата производят по методу определения алкокси групп, как уже описано. Из найденного количества бром- вычитают количество брома, связанного с аминопирими дином. Разность приходится на бромаминопиримидин.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕТУЧИХ ПРИМЕСЕЙ

Проводится высушиванием навески в количестве око ло 2 г в сушильном шкафу при 100—105° до постоянног веса.

АЦЕТОПРОПИЛАЦЕТАТ

$CH_3COCH_2CH_2CH_2OCOCH_3$ М. вес 144,173

Жидкость желтоватого цвета. Т. кип. 108—115° при 22 мм остаточного давления.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ ПО ОКСИМУ

(метод разработан во ВНИВИ В. М. Иосиковой, В. В. Зворыкиной, Е. Н. Чесалиной)

Метод основан на том, что вещества, содержащие CO-группу, реагируют с гидрохлоридом гидроксиламина. Освобождающаяся при этом HCl отщепляется и может быть количественно определена. По количеству освободившейся HCl судят о количественном содержании CO, так как реакция оксимирования является эквимолекулярной:

1. $CH_3COCH_2CH_2CH_2OH + NH_2OH \cdot HCl \rightarrow$
$\rightarrow CH_3C(=NOH)CH_2CH_2CH_2OH + H_2O + 2HCl.$

2. $HCl + NaOH \rightarrow NaCl + H_2O.$

В коническую колбу вносят точную навеску испытуемого продукта в количестве около 1 г. К навеске приливают 15 мл спиртового раствора гидроксиламина гидрохлорида, содержащего индикатор (бромфеноловый синий), колбу закрывают резиновой пробкой и оставляют на 2 часа в покое, после чего смесь оттитровывают 0,5 н. спиртовым раствором KOH или NaOH.

В начале титрования раствор имеет золотисто-желтый цвет. При дальнейшем прибавлении щелочи он мутнеет от выделяющегося осадка NaCl. Конец титрования определяют по появлению бутылочно-зеленой окраски раствора. Так как спиртовой раствор гидроксиламина гидрохлорида имеет кислую реакцию, необходимо вводить на него поправку.

Для этого 15 мл раствора гидроксиламина гидрохлорида титруют 0,5 н. спиртовым раствором щелочи до появления зеленого с красноватым оттенком окрашивания. Количество миллилитров спиртового раствора щелочи, пошедшее на контрольный опыт, вычитают из количества щелочи, пошедшего на титрование навески.

Расчет процентного содержания ацетопропилацетата в продукте (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0,07208 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,5 н. спиртового раствора щелочи, пошедшее на титрование, за вычетом поправки на контрольный опыт, в мл;
0,07208 — количество ацетопропилацетата, соответствующее 1 мл точного 0,5 н. спиртового раствора щелочи, в г;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ В ТЕХНИЧЕСКОМ ПРОДУКТЕ

В связи с тем что в техническом продукте может содержаться примесь ацетопропилового спирта, которая участвует в реакции оксимирования и может привести к получению завышенных результатов при анализе описанным методом, применяют другой способ анализа, основанный на разгонке смеси.

Для этого во взвешенную на технических весах колбу Кляйзена вносят 100 г ацетопропилацетата для разгонки в вакууме. В предварительно взвешенный приемник собирают фракцию, отгоняющуюся в пределах 108—115° при остаточном давлении 22 мм. Собранную фракцию взвешивают, количество ее отвечает содержанию ацетопропилацетата.

При работе с остаточным давлением выше 22 мм каждые 2 мм разницы в давлении повышают температуру кипения на 1° (например, при разгонке при 38 мм остаточного давления разница составляет 16 мм и температура кипения будет завышена на 8°).

При работе с остаточным давлением ниже 22 мм каждый 1 мм разницы в давлении снижает температуру кипения на 2° (например, при разгонке с 12 мм остаточного давления разница составляет 10 мм и температура кипения продукта снижается на 20°).

Можно проводить разгонку без вакуума; при этом фракция, собранная при 207—217°, будет соответствовать пропилацетату, а фракция, собранная до 207°, — примесям.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ПРИМЕСЕЙ

Около 2 г ацетопропилацетата взвешивают на аналитических весах, помещают в коническую колбу, содержащую 15—20 мл этилового спирта, и титруют 0,1 н. спиртовым раствором KOH или $NaOH$ в присутствии фенолфталеина до появления розового окрашивания.

Расчет процентного содержания примесей в препарате (x_1) производят по формуле:

$$x_1 = \frac{v \cdot 1,44173}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора щелочи, пошедшее на титрование, в мг;
a — навеска в г;
1,44173 — постоянный коэффициент.

Примечание. В случае отбора пробы объемом 2 мл в знаменателе должна находиться еще величина d (уд. вес ацетопропилацетата).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ ПО АЦЕТИЛЬНЫМ ГРУППАМ

Навеску ацетопропилацетата в количестве около 0,2 г, взятую на аналитических весах при помощи пипетки для взвешивания, омыляют в колбе, снабженной воздушным или обратным холодильником, на водяной бане при 85—90° в течение 1 часа с помощью 20 мл 0,1 н. спиртового раствора KOH.

По окончании омыления содержимое колбы охлаждают и титруют избыток щелочи 0,1 н. раствором HCl в присутствии фенолфталеина до исчезновения окраски.

Параллельно проводят холостой опыт с тем же количеством щелочи.

Расчет процентного содержания ацетильных групп в пересчете на ацетопропилацетат (x_2) производят по формуле.

$$x_2 = \frac{(v - v_1) \cdot 1,44173}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора HCl, пошедшее на титрование холостого опыта, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора HCl, пошедшее на титрование испытуемой пробы, в мл;
1,44173 — постоянный коэффициент;
a — навеска в г.

Пользуясь этими методами, можно вычислить процентное содержание ацетопропилацетата в испытуемом продукте (x_3) по формуле:

$$x_3 = x_2 - x_1$$

Значение x_2 и x_1 см. выше.

БРОМАЦЕТОПРОПИЛАЦЕТАТ

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ C - OH \\ \| \\ CHBrCH_2CH_2OCOCH_3 \end{array}$$

М. вес 224,089

Густая маслянистая жидкость темного или бурого цвета с резким раздражающим запахом. Уд. вес 1,463. Растворим в хлороформе. Чрезвычайно сильно действует на глаза и требует осторожного обращения. При бромировании ацетопропилацетата бром может присоединиться не только в α-, но и в β-положении; в препарате может также присутствовать примесь свободного HBr и непрореагировавший ацетопропилацетат (Я. Слободин, М. Зигель, М. Янишевская, 1943).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА БРОМА
(α-, β- и примеси)

(метод разработан во ВНИВИ В. М. Иосиковой, В. В. Зворыкиной, Е. Н. Чесалиной)

Метод анализа основан: на определении общего количества брома (α-, β- и свободный), определяемого после омыления вещества спиртовой щелочью; определении β-брома путем нагревания спиртового раствора вещества, причем бром, находящийся в α-положении, в данных условиях не отщепляется и не определяется без предварительного омыления. Примеси брома определяются титрованием на холоду по Фольгарду; при этом бром, вступивший в β-положение, не определяется.

В мерную колбу с притертой пробкой емкостью 50 мл отвешивают 2 г испытуемого продукта, навеску растворяют в 96% этиловом спирте, доводят спиртом до метки и хорошо перемешивают. Из полученного раствора отбирают 5 мл в колбу емкостью 250 мл, снабженную обратным холодильником, туда же добавляют 10 мл 1% спиртового раствора KOH, содержимое колбы нагревают на водяной бане в течение 15 минут при 85—90°.

По истечении указанного времени колбу охлаждают водой, к ее содержимому добавляют 50 мл дистиллированной воды, 15 мл азотной кислоты, разбавленной водой в отношении 1:1, 25 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$, 0,5 мл раствора железоаммониевых квасцов и смесь титруют 0,1 н. раствором NH_4CNS или KCNS до появления слабого розоватого окрашивания.

Вычисление содержания общего количества брома в миллиграммах во взятой навеске (x) производят по формуле:

$$x = (v - v_1) \cdot 7,992,$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, взятое на определение, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора KCNS или NH_4CNS, пошедшее на титрование, в мл;
7,992 — количество брома, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора роданата, в мг.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА ПРИМЕСЕЙ БРОМА
(β-бром и броматы)

В колбу емкостью 250 мл, снабженную обратным холодильником, помещают 5 мл испытуемого спиртового раствора бромацетопропилацетата (см. выше) и 10 мл 96% этилового спирта. Содержимое колбы нагревают на водяной бане 15 минут при 85—90°.

Дальнейший ход анализа см. выше.

Вычисление содержания общего количества примесей брома в продукте в миллиграммах во взятой навеске (x_1) производят по формуле:

$$x_1 = (v_2 - v_3) \cdot 7,992,$$

где v_2 — количество точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, взятое в анализ, в мл;
v_3 — количество точного 0,1 н. раствора роданата, пошедшее на титрование, в мл;
7,992 — см. выше.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БРОМА, НЕ ВСТУПИВШЕГО В РЕАКЦИЮ

(бром в бромистых солях)

В колбу емкостью 250 мл помещают 5 мл испытуемого спиртового раствора, 10 мл 96% этилового спирта, 50 мл дистиллированной воды, 15 мл HNO_3, разведенной водой в отношении 1 : 1, 25 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$, 0,5 мл раствора железоаммониевых квасцов и смесь титруют 0,1 н. раствором KCNS или NH_4CNS, как указано выше.

Количество брома, не вступившего в реакцию, в миллиграммах (x_2), вычисляют по формуле:

$$x_2 = (v_4 - v_5) \cdot 7,992,$$

где v_4 — см. v_2;
v_5 — см. v_3;
7,992 — см. выше.

Процентное содержание α-бромацетопропилацетата вычисляют по формуле:

$$y = \frac{(x - x_1) \cdot 224,089 \cdot 50 \cdot 100}{a \cdot 5 \cdot 79,92 \cdot 1000},$$

где y — чистота продукта в %;
x — см. выше;
x_1 — см. выше;
a — количество точного 0,1 н. $AgNO_3$, взятое в анализ, в мл;
224,089 — молекулярный вес бромацетопропилацетата;
50 — разведение навески в мл;
5 — количество спиртового раствора, взятое для анализа, в мл;
79,92 — м. вес брома;

1000 — пересчет в г;
100 — пересчет в %.

В сокращенном виде формула приобретает следующее значение:

$$y = \frac{(x - x_1) \cdot 2,8}{a}.$$

Содержание брома, вступившего в реакцию в β-положение:

$$m = \frac{(x_1 - x_2) \cdot 50 \cdot 100}{a \cdot 5 \cdot 1000},$$

где m — количество β-бромацетопропилацетата в продукте в %.

Остальные обозначения см. выше.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЦЕТИЛЬНЫХ ГРУПП В ПРОДУКТЕ

Уксусная кислота, образующаяся при гидролизе серной кислотой продукта, содержащего ацетильную группу, в присутствии этилового спирта этерифицируется в уксусноэтиловый эфир, который отгоняют вместе с избытком спирта в приемник, содержащий раствор щелочи, подвергают гидролизу и определяют избыток щелочи, не вступившей в реакцию с уксусной кислотой, освободившейся при гидролизе эфира. Химизм процесса можно представить в следующем виде:

$$ROCOCH_3 + C_2H_5OH \xrightarrow{H_2SO_4} ROH + CH_3COOC_2H_5$$
$$CH_3COOC_2H_5 + H_2O \rightarrow C_2H_5OH + CH_3COOH$$
$$CH_3COOH + 3NaOH \rightarrow NaCH_3COO + H_2O + 2NaOH$$
$$2NaOH + H_2SO_4 \rightarrow Na_2SO_4 + H_2O$$

0,5 мл бромацетопропилацетата (уд. вес 1,463) переносят в колбу Вюрца емкостью 250 мл при помощи автоматической пипетки. Отдельно приготовляют 30 мл смеси, состоящей из 2 мл концентрированной H_2SO_4 (уд. вес 1,84) и 30 мл абсолютного этилового спирта. Пипетку, которой брали бромацетопропилацетат, осторожно (до метки!) промывают в ту же колбу небольшим количеством (2—3 мл) указанной смеси, а оставшееся ее количество вносят в колбу небольшими порциями при взбалтывании содержимого колбы. В горло колбы встав-

ляют на пробке капельную воронку, конец которой находится ниже отводной трубки колбы. Колбу соединяют с холодильником Либиха. В качестве приемника берут колбу, используемую в дальнейшем для гидролиза. В приемник вносят 25 мл 0,5 н. спиртового раствора КОН. В капельную воронку наливают 20 мл абсолютного этилового спирта. Колбу с содержимым медленно нагревают на водяной бане (нагретой до кипения), прибавляя в нее из делительной воронки по каплям спирт со скоростью, равной скорости отгона.

После прибавления всего количества спирта кран воронки закрывают и перегонку продолжают еще в течение 10—12 минут, пока в колбе останется около 15 мл жидкости.

Перегонку прекращают, приемник присоединяют к обратному холодильнику и содержащийся в приемнике уксусноэтиловый эфир подвергают омылению на водяной бане в течение 15 минут при 70—80°.

По охлаждении к содержимому приемника добавляют 100 мл воды (воду вводят через холодильник), к смеси добавляют 3—5 капель спиртового раствора фенолфталеина и избыток щелочи титруют 0,5 н. раствором H_2SO_4 до исчезновения окрашивания.

Параллельно ставят контрольный опыт: для этого в колбу вносят 25 мл 0,5 н. спиртового раствора КОН, гидролиз проводят с обратным холодильником на водяной бане в течение 15 минут при 70—80°. По охлаждении добавляют в колбу через холодильник 100 мл воды, к смеси добавляют 3—5 капель спиртового раствора фенолфталеина и титруют 0,5 н. раствором H_2SO_4, как описано.

Расчет процентного содержания бромацетопропилацетата по ацетильным группам (x) производят по формуле:

$$x = \frac{43,03 \cdot (v - v_1) \cdot 100}{10 \cdot 2 \cdot a \cdot 19,5 \cdot d},$$

где 43,03 — м. вес ацетильной группы;
$v - v_1$ — разность между результатами титрования контрольного опыта (v) и продукта гидролиза (v_1) в мл;
100 и 10 — постоянные коэффициенты;
2 — эквивалент H_2SO_4 по CH_3CO;
a — навеска в г;
d — уд. вес;
19,5 — процентное содержание CH_3CO в бромацетопропилацетате;
100 — пересчет в %.

Описанный метод может оказаться полезным при необходимости определения примеси ацетопропилацетата в бромацетопропилацетате.

Разность между процентным содержанием бромацетопропилацетата по ацетильной группе и по брому приходится на долю свободного ацетопропилацетата.

ФОРМАМИД

(амид муравьиной кислоты)

$HCONH_2$ М. вес 45,043

Бесцветная подвижная жидкость со своеобразным запахом, уд. вес 1,135, т. кип. 114°. Очень хорошо растворим в воде и спирте, нерастворим в эфире. При хранении разлагается.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО АЗОТА

(Метод анализа разработан во ВНИВИ В. М. Иосиковой, В. В. Зворыкиной, Е. Н. Чесалиной)

Навеску формамида в количестве 0,05—0,07 г, взятую на аналитических весах с помощью пипетки для взвешивания, помещают в кьельдалевскую колбу емкостью 50—100 мл, прибавляют 3 мл концентрированной H_2SO_4 (уд. вес 1,84), несколько кристалликов $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ и содержимое колбы сжигают до полного обесцвечивания. Далее поступают, как указано в определении ацетонитрила.

Расчет процентного содержания азота в продукте (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0,14}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора H_2SO_4, взятое в приемную колбу, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;
0,14 — постоянный коэффициент;
a — навеска в г.

УПРОЩЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Навеску формамида в количестве около 0,1 г переносят в колбу для отгона, снабженную капельной воронкой и соединенную с парообразователем, добавляют 50 мл воды и через капельную воронку 15 мл 40% раствора NaOH, через колбу пропускают из парообразователя пар, а отгоняющийся аммиак собирают в приемную колбу, куда заранее внесено из бюретки точное количество 0,1 н. раствора H_2SO_4 (обычно 20 мл) с 2—3 каплями метилового красного в качестве индикатора. По окончании отгонки аммиака (на что уходит 15—20 минут) содержимое приемной колбы оттитровывают 0,1 н. раствором NaOH.

Расчет процентного содержания азота в веществе (x) вычисляют по формуле, приведенной выше.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСИ МУРАВЬИНОКИСЛОГО АММОНИЯ

Метод основан на реакции замещения группы NH_4 на Na в муравьинокислом аммонии:

$$HCOONH_4 + NaOH \rightarrow HCOONa + NH_4OH.$$

По количеству израсходованной щелочи судят о количестве муравьинокислого аммония.

1 мл формамида помещают в коническую колбу, добавляют 10—15 мл воды и титруют 0,1 н. раствором NaOH в присутствии фенолфталеина до появления розового окрашивания.

Расчет процентного содержания муравьинокислого аммония в формамиде (x_1) вычисляют по формуле:

$$x_1 = \frac{v \cdot 0{,}63}{a_1 \cdot d},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;
0,63 — постоянный коэффициент;
a_1 — количество формамида, взятое на анализ, в мл;
d — удельный вес формамида.

Расчет процентного содержания азотистых примесей (x_2) в формамиде производят по формуле:

$$x_2 = \frac{v \cdot 0{,}14}{a_1 \cdot d},$$

где 0,14 — постоянный коэффициент;
v, a_1 и d — см. выше.

Расчет процентного содержания формамида в препарате (x_3) производят по формуле:

$$x_3 = \frac{(x_1 - x_2) \cdot 100 \cdot 45{,}043}{14 \cdot 100},$$

где 45,043 — м. вес формамида;
14 — ат. вес азота;
x_1 и x_2 — см. выше.

При сокращении формула приобретает значение:

$$x_3 = (x_1 - x_2) \cdot 3{,}2173.$$

ТИАЗОЛ

(4-метил-5-оксиэтилтиазол)

```
      CH3
      |
     C = C — CH2 — CH2OH
   N/     |
    \CH—S
```

М. вес 143,212

Густая маслянистая жидкость желтоватого цвета с характерным стойким запахом. Уд. вес 1,2 (при 20°), т. кип. 136—137° при 7 мм. Растворим в воде, спирте, эфире, хлороформе, дихлорэтане.

Для определения тиазола предложен ряд методов, основанных как на определении его по азоту или по сере, входящих в состав его молекулы (методы химические), так и на его способности поглощать свет в ультрафиолетовой области спектра (рис. 18).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПО СЕРЕ

(метод анализа разработан во ВНИВИ В. М. Иосиковой, В. В. Зворыкиной, Е. Н. Чесалиной)

В круглодонную колбу емкостью 0,5 л из стекла Пирекс с пришлифованным воздушным холодильником, высотой не менее 1,25 м, вносят 3 г кристаллического $KMnO_4$ и 0,75 г кристаллического KOH. В колбу помещают точную навеску вещества в количестве около 0,2 г, колбу закрывают холодильником и через него вводят в колбу небольшими порциями 30 мл воды.

Содержимое колбы нагревают в вытяжном шкафу, на электроплитке через слой асбеста, вначале осторож-

но, а затем доводят до слабого равномерного кипения. По истечении 3 часов окисление вещества заканчивается. Содержимому колбы дают охладиться до комнатной температуры и через холодильник маленькими порциями вносят в колбу около 30 мл концентрированной HCl

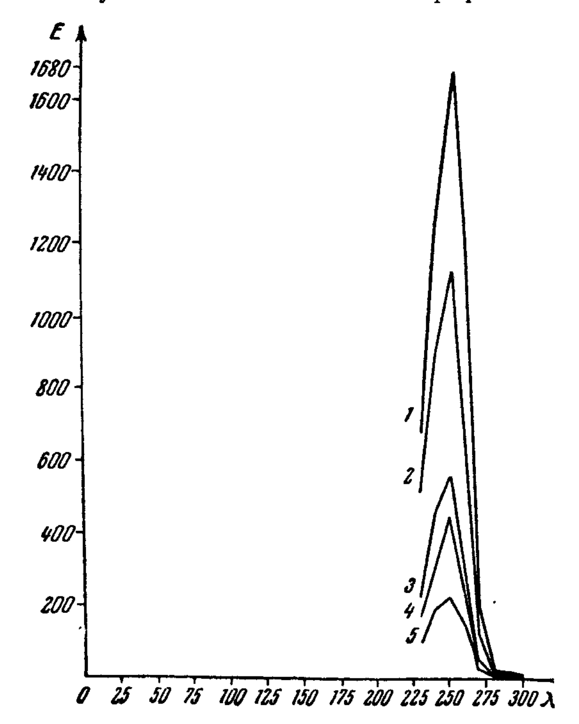


Рис. 18. Абсорбционные кривые тиазола.
1 — 100% тиазола; 2 — 67,3% тиазола; 3 — 33,5% тиазола; 4 — 27% тиазола; 5 — 13,8% тиазола.

(уд. вес 1,19) до прекращения выделения паров. Колбу вновь помещают на электроплитку и содержимое ее нагревают до прекращения изменения цвета раствора.

Охлажденный раствор количественно переносят из колбы в стакан, смывая стенки колбы 25—30 мл воды; содержимое стакана нагревают до кипения и обрабатывают при помешивании стеклянной палочкой, нагретой до кипения смесью, состоящей из 30 мл 5% раствора $BaCl_2$ и 15 мл 5% раствора NH_4Cl. Образовавшемуся

осадку $BaSO_4$ дают отстояться и по охлаждении содержимое стакана отфильтровывают через беззольный фильтр; стакан, палочку и осадок на фильтре промывают водой до отсутствия в промывных водах реакции на хлор (проба с раствором азотнокислого серебра).

Фильтр с осадком переносят в прокаленный и взвешенный фарфоровый тигель, вначале осторожно обугливают на электроплитке или горелке, а затем слегка прокаливают, охлаждают, добавляют 0,5 мл концентрированной H_2SO_4, вновь обугливают на электроплитке до прекращения выделения паров и прокаливают в тигельной или муфельной печи при красном калении до постоянного веса.

Вычисление процентного содержания тиазола в препарате (x), производят по формуле:

$$x = \frac{143,212 \cdot 32,06 \cdot b \cdot 100}{32,06 \cdot a \cdot 233,44},$$

где 143,212 — м. вес 4-метил-5-оксиэтилтиазола;
32,06 — ат. вес серы;
233,44 — м. вес $BaSO_4$;
b — вес сернокислого бария в г;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

При сокращении формула приобретает значение:

$$x = \frac{b \cdot 61,3485}{a}.$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТОДОМ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ

Около 1 г тиазола (точная навеска) вносят в колбу, снабженную пришлифованным холодильником, туда же добавляют из микробюретки точно 1 мл уксусного ангидрида и смесь нагревают в течение 1 часа на кипящей водяной бане. Через холодильник в колбу приливают 50 мл воды и содержимое ее нагревают точно 5 минут на кипящей водяной бане. Колбу быстро охлаждают струей холодной воды, холодильник промывают водой и весь раствор количественно переносят в мерную колбу емкостью 200 мл, доводя раствор водой до метки. Отбирают 20 мл и титруют 0,1 н. раствором NaOH до появления бледно-розового окрашивания (индикатор фенолфталеин). Параллельно ставят контрольный опыт на реактивы.

Содержание тиазола в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1)\cdot 0{,}01432\cdot 200\cdot 100}{a\cdot 20} = \frac{(v - v_1)\cdot 14{,}3}{a},$$

где v — количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование контрольного опыта, в мл;
v_1 — количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование испытуемой пробы, в мл;
0,01432 — количество тиазола, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора NaOH, в г;
200 — разведение в мл;
20 — количество раствора, взятое на титрование, в мл;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

(по В. А. Девятнину и Г. А. Федоровой, 1958)

Точную навеску испытуемого образца тиазола в количестве 250 мг растворяют в воде в мерной колбе емкостью 25 мл. После тщательного перемешивания отбирают 1 мл раствора в мерную колбу емкостью 200 мл. Полученный раствор промеряют в закрытых кюветах на спектрофотометре с включением водородной лампы при λ= 230—300 mμ, производя измерения через 10 mμ.

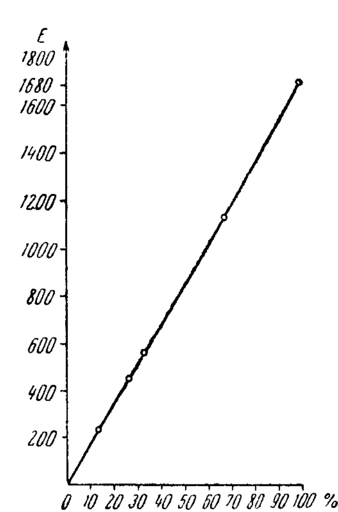


Рис. 19. Кривая зависимости концентрации от экстинкции для тиазола.

Расчет процентного содержания 4-метил-5-оксиэтилтиазола в испытуемом образце (x) производят по формуле.

$$x = \frac{E}{16{,}8},$$

где E — найденная экстинкция при 250 mμ;
16,8 — постоянный коэффициент.

На рис. 19 представлен калибровочный график для определения качества тиазола. Опуская перпендикуляр из точки, соответствующей найденной экстинкции, находим на оси абсцисс соответствующее значение концентрации вещества в процентах.

ИСПЫТАНИЕ ТИАЗОЛА НА РАСТВОРИМОСТЬ

В градуированную пробирку вносят 2—3 мл тиазола и равный объем дистиллированной воды, энергично встряхивают в течение 2—3 минут и оставляют в покое. Тиазол, не содержащий посторонних примесей, должен полностью раствориться; наличие двух слоев указывает на загрязненность препарата и на непригодность его для технологического процесса.

ВИТАМИН B_1 (ТИАМИН)

H_3C — N — $NH_2\cdot HCl$ — CH_3 — $CH_2\cdot CH_2OH$ — N — CH_2 — $\overset{+}{N}$ — S — Cl

Физико-химические свойства тиамина

Показатель	Характеристика
Состояние вещества	Бесцветные иглы
Формула	$C_{12}H_{18}ON_4SCl_2$ (хлорид гидрохлорид) $C_{12}H_{18}ON_4SBr_2\cdot {}^1/_2H_2O$ (бромид гидробромид)
Молекулярный вес	337,29 (хлорид); 435,2 (бромид)
Температура плавления	246—250° (разл.) — хлорид 210—215° (разл.) — бромид
Растворимость	В воде 100/100, в этиловом 95% спирте 1/100, в 100% — 0,3/100, в глицерине 5/100. Нерастворим в эфире, ацетоне, бензоле, хлороформе
Оптическая активность	—

Продолжение

Показатель	Характеристика
Биологическая активность	1 г кристаллического витамина B_1 — 333 000 ИЕ
Максимум абсорбции	245—247 mμ
Флуоресценция	Для тиохрома — голубая
Абсорбционный максимум флуоресценции	260—270 mμ
pH 1% водного раствора	3,13

ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИАМИНА

Принцип метода заключается в том, что тиамин при окислении в щелочной среде красной кровяной солью превращается во флуоресцирующее вещество — тиохром:

H_3C—, N, N, S, CH_2CH_2OH, N, N, CH_3

Тиохром извлекают растворителями, не смешивающимися с водой (изобутиловый, изоамиловый спирт) и флуоресценцию раствора измеряют при помощи флуорометра[1].

Определение тиамина в таблетках и драже

1 г порошка растертых таблеток или драже (точная навеска), содержащих около 5 мг тиамина, растворяют при слабом нагревании в воде в мерной колбе емкостью 250 мл, доводят водой до метки и фильтруют. 5 мл фильтрата переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Из полученного раствора отбирают 3 пробы по 1 мл в капельные воронки с притертыми пробками и добавляют туда же по 4 мл воды; в первую и вторую воронки приливают по 3 мл окислительной смеси, а в третью —

[1] Описание флуорометра см «Методы определеиия витамиов». Пищепромиздат, 1954.

3 мл 15% раствора едкого натра и встряхивают. Из бюретки к содержимому всех воронок приливают по 12 мл изобутилового, изоамилового или бутилового спирта, встряхивают 2 минуты и дают разделиться слоям. Водный слой удаляют, а спиртовой фильтруют через бумажный фильтр, в который помещают небольшое количество прокаленного сульфата натрия, в кюветы флуорометра.

Отбирают по 1 мл стандартного рабочего раствора тиамина и переносят их в делительные воронки, туда же прибавляют по 4 мл воды и далее обрабатывают так, как описано выше, добавляя во вторую воронку только раствор щелочи.

Растворы тиохрома предохраняют от света. Вначале измеряют флуоресценцию стандартного рабочего раствора и контрольной пробы к нему (только со щелочью), а затем флуоресценцию испытуемых растворов и контрольной пробы к ним.

Содержание витамина B_1 в миллиграммах в 1 шт. таблеток или драже (x) вычисляют по формуле:[1]

$$x = \frac{(A - B)\cdot b\cdot v\cdot v_2\cdot d}{(A_1 - B_1)\cdot a\cdot v_1\cdot v_3\cdot 1000},$$

где A — показания флуорометра для испытуемого раствора;
B — показания флуорометра для контрольной пробы к нему;
A_1 — показания флуорометра для стандартного рабочего раствора;
B_1 — показания флуорометра для контрольной пробы к нему;
a — навеска в г;
b — количество тиамина в 1 мл стандартного рабочего раствора в гаммах;
v — объем, в котором растворена навеска, в мл;
v_1 — объем раствора, взятый для приготовления испытуемого рабочего раствора, в мл;

[1] При аиализе драже и таблеток, содержащих тиаминбромид, полученный результат умножают на 1,29 Качественная реакция на характер галоида к испытуемому раствору добавляют равный объем хлорной воды и несколько капель хлороформа При иаличии брома последиий окрашивается в бурый цвет

v_2 — объем второго разведения в мл;
v_3 — объем испытуемого раствора, взятого на окисление, в мл;
1000 — пересчет в мг;
d — средний вес 1 шт. драже или таблеток в г.

ОБЪЕМНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИАМИНА

Определение тиаминбромида-гидробромида[1]

Около 0,3 г препарата (точная навеска) растворяют в 30 мл воды и титруют 0,1 н. раствором едкого натра до голубовато-зеленого окрашивания (индикатор—бромтимоловый синий). После титрования раствор подкисляют азотной кислотой, прибавляют 1 мл раствора железоаммониевых квасцов, 0,1 мл 0,1 н. раствора роданистого аммония и титруют 0,1 н. раствором азотнокислого серебра до исчезновения окраски. Из количества миллилитров 0,1 н. раствора азотнокислого серебра, израсходованного при последнем титровании, вычитают 0,1 мл 0,1 н. раствора роданистого аммония и количество миллилитров 0,1 н. раствора едкого натра, затраченного на первое титрование.

Содержание тиаминбромида-гидробромида в препарате в процента (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1)\cdot 0,04352\cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, пошедшее на титрование, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;
0,04352 — количество тиаминбромида-гидробромида, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;
100 — пересчет в %;
a — навеска в г.

Определение тиаминхлорида-гидрохлорида[2]

Около 1 г препарата (точная навеска) растворяют в воде в мерной колбе емкостью 100 мл и доводят водой до метки (раствор А). Из полученного раствора отбирают в коническую колбу 20 мл, прибавляют 10—15 мл воды, 5—6 капель индикатора бромтимолового синего и титруют 0,1 н. раствором NaOH до появления голубовато-зеленого окрашивания.

Отбирают 20 мл раствора А в коническую колбу, прибавляют 1 мл HNO_3 (разведенной 1:1), 15 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$ (из бюретки), 20—30 мл воды, взбалтывают и титруют 0,1 н. раствором NH_4CNS в присутствии 1 мл раствора железоаммониевых квасцов до появления розового окрашивания.

Содержание тиаминхлорида-гидрохлорида в препарате в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{[(15 - v) - v_1]\cdot 0,03373\cdot 100\cdot 100}{a\cdot 20},$$

где 15 — количество точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, взятое для связывания галоида, в мл;
v — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора NH_4CNS, пошедшее на титрование, в мл;
0,03373 — количество тиаминхлорида-гидрохлорида, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;
100 — объем разведения в мл;
a — навеска в г;
20 — количество раствора, взятое для титрования, в мл.

Примечание. При содержании в препарате более 0,2% золы определение производят флуорометрическми методом или методом, описанным ниже.

Объемный метод определения в неводных растворителях. Весьма перспективный метод титрования органических соединений в неводных растворителях основан на теории Бренстед и Лоури, согласно которой сила кислот и оснований не обязательно является функцией степени ионизации, и, что кислота, будучи сильной в водных растворах может быть еще более сильной в среде органического растворителя. Это касается и оснований. Так, хлорная, серная, соляная и трихлоруксусная кислоты равносильные в водном растворе, в безводной уксусной

[1] Госфармакопея СССР. IX изд. 1961 г.
[2] МРТУ 42 № 2820-61.

кислоте располагаются в порядке убывающей силы следующим образом:

хлорная → серная → соляная → трихлоруксусная.

(В равной мере это относится и к основаниям.)

На этом принципе построены методы титрования органических соединений в неводных растворителях.

По этому вопросу имеется обширная литература, с исчерпывающей полнотой представленная в соответствующих монографиях[1].

В химико-аналитической лаборатории ВНИВИ В. А. Девятниным и М. Я. Мойжес разработан способ анализа тиаминов с помощью неводного титрования, отличающийся от опубликованных в литературе методов.

Около 0,1 г препарата (точная навеска) растворяют в 20 мл безводной уксусной кислоты, прибавляют 5 мл 5% раствора уксуснокислой ртути, приготовленной на безводной уксусной кислоте и титруют 0,1 н. раствором хлорной кислоты в безводной уксусной кислоте в присутствии нескольких капель индикатора кристаллического фиолетового до появления изумрудно-зеленой окраски раствора. Одновременно ставят контрольный опыт на реактивы.

Примечание. Раствор уксуснокислой ртути прибавляют лишь в случае анализа галогенидов.

Содержание тиамина в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot K \cdot 100}{a},$$

где v — количество 0,1 н. раствора хлорной кислоты, пошедшее на титрование препарата, в мл;

v_1 — количество 0,1 н. раствора хлорной кислоты, пошедшее на титрование контрольной пробы, в мл;

a — навеска в г;

100 — пересчет в %;

K — количество тиамина, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора хлорной кислоты, в г:

[1] Шанти Р. Палит, Мехр Натх Дас, Г. Р. Сомаядулу. Неводное титрование ГНТИЗд-во хим лит., М., 1958. Крешков А. П., Быкова Л. Н., Казарян Н. А , Ахдарова Н. Ш. и др. Усп. хим., 1962, 31, 4, 490—526.

тиаминхлорид-гидрохлорид	— 0,01686
тиаминбромид-гидробромид	— 0,02176
тиаминмононитрат	— 0,01635
тиотиамин	— 0,02963
тиаминпропилдисульфид	— 0,03563

ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Метод полярографического определения тиамина в драже и таблетках, содержащих один или несколько витаминов, разработан в Украинском научно-исследовательском институте пищевой промышленности А. И. Шкодиным и Г. П. Тихомировой[1].

Определение в драже и таблетках с витамином B_1

Драже и таблетки с витамином B_1

Навеску средней пробы растертых в порошок драже или таблеток в количестве 1—1,5 г растворяют в мерной колбе емкостью 50 или 100 мл в 0,1 н. растворе KCl. Раствор фильтруют и около 10 мл его наливают в электролизер. После 15-минутного пропускания через раствор тока водорода или азота снимают полярограмму.

Можно воспользоваться методом калибровочных графиков или методом добавок.

Калибровочный график строят следующим образом: навески кристаллического тиамина в количестве 2, 5, 8, 10 и 12 мг растворяют в 50 или 100 мл 0,1 н. раствора KCl. Для каждого раствора в отдельности снимают полярограмму и определяют высоту волны. На графике по оси абсцисс откладывают концентрации тиамина, по оси ординат — соответствующие высоты волн. Полученные точки соединяют прямой линией.

Определение методом добавок производят следующим образом: после снятия полярограммы испытуемого раствора приготовляют смесь из 9 мл испытуемого раствора и 1 мл стандартного раствора, содержащего 5 мг тиамина в 1 мл 0,1 н. раствора KCl, и полярографируют.

[1] Метод доложен Г. П. Тихомировой на совещании по химии и технологии витамнпов в Институте органической химии АН СССР в 1954 г.

Расчет содержания тиамина в испытуемой пробе (x) в данном случае производят по формуле:

$$x = \frac{c \cdot h \cdot v \cdot d}{h_1 \cdot a},$$

где c — концентрация стандартного раствора в мг/мл;
h — высота волны испытуемого раствора в мм;
h_1 — высота волны после добавки стандартного раствора в мм;
v — объем, в котором растворена навеска, в мл;
d — вес 1 шт. драже или таблеток в г;
a — навеска в г.

Драже поливитаминное

Навеску средней пробы растертого в порошок драже в количестве 7—10 г растворяют в 100 мл 0,1 н. раствора HCl. К раствору по каплям прибавляют 4% раствор $KMnO_4$ до появления неисчезающей бурой окраски. Отстоявшийся раствор фильтруют. Около 10 мл фильтрата наливают в электролизер и полярографируют после пропускания тока водорода.

Определение производится по методу добавок, как описано выше.

ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИАМИНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Навеску испытуемого материала около 5—10 г в зависимости от ожидаемого содержания тиамина[1] тщательно растирают в ступке с 10—25 мл 0,1 н. раствора серной кислоты, переносят в колбу, доводят объем тем же раствором приблизительно до 75 мл.

[1] Для дрожжей навеска составляет 2,5 г, и после ферментативной обработки фильтрата непосредственно используют для окисления без адсорбции. Жидкие объекты, например молоко, берут в количестве 75 мл, подкисляют крепкой серной кислотой до 0,1 н. концентрации кислоты в растворе. Дальше проводят анализ, как описано. Для высушенных объектов берут навеску 1—3 г.

В колбу вставляют воронку и помещают ее в кипящую водяную баню на 45 минут, время от времени перемешивая ее содержимое.

По истечении указанного времени содержимое колбы охлаждают до 35—40° и добавляют в нее взвесь мицелия грибка Penicillium или Aspergillius oryzae из расчета 0,03 г мицелия на 1 г сухого вещества навески. Для этого навеску мицелия растирают в ступке с 2—3 мл 2,5 М раствора уксуснокислого натрия и содержимое ступки количественно переносят при помощи 2—3 мл того же раствора в колбу, доводя pH вытяжки в колбе раствором уксуснокислого натрия до 5. После этого колбу помещают на 15—18 часов в термостат при 38°[1]. По истечении указанного времени содержимое колбы доводят водой до 100 мл и фильтруют.

10—20 мл фильтрата пропускают через адсорбент декальсо (синтетический натриевый алюмосиликат $Na_2O \cdot Al_2O_3 \cdot 6SiO_3$)[2] для адсорбции тиамина следующим образом: заготовляется стеклянная колонка, имеющая в верхней части диаметр 2,5 см и длину 9 см, в средней части диаметр 0,7 см и длину 15 см и в нижней части диаметр 0,5 см, внутренний диаметр 0,03 см и длину 3 см. Колонку укрепляют на пробке в мерном цилиндре емкостью 100 мл.

В средней части колонки помещают стеклянную вату, насыпают адсорбент слоем 6 см и промывают его 10 мл 3% раствора CH_3COOH, после чего пропускают испытуемый раствор и промывают адсорбент 3 раза дистиллированной водой порциями по 10 мл.

Содержимое цилиндров выливают, цилиндры тщательно промывают водой и элюируют тиамин из адсорбента при помощи 15—20 мл кипящего 25% раствора KCl в 0,1 н. растворе HCl, доводят объем элюата в цилиндре до 25 мл.

По 5 мл полученного раствора помещают в три делительные воронки; в первую и во вторую прибавляют по 3 мл окислительной смеси, перемешивают и прибавляют по 12 мл изобутилового, бутилового или изоамилового спирта. В третью пробирку, служащую для холостого опыта, прибавляют 3 мл 15% раствора NaOH, переме-

[1] Ферментативная обработка может быть также проведена при 50° в течение 3 часов.

[2] Приготовление его см. в конце книги.

шивают и прибавляют 12 мл изобутилового, бутилового или изоамилового спирта. Содержимое пробирок встряхивают 2 минуты и фильтруют через бумажный фильтр, куда помещено небольшое количество сульфата натрия, в кюветы флуорометра.

Одновременно готовят стандартный раствор тиохрома, как было описано выше, и контроль к нему.

Вначале производят измерение флуоресценции в стандартном растворе и в контрольном опыте к нему, а затем в испытуемых растворах и в контрольном опыте к ним.

Содержание тиамина в миллиграмм-процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(A - B)\cdot 100\cdot 25\cdot 100}{(A_1 - B_1)\cdot a\cdot v\cdot 5\cdot 1000},$$

где A — показания флуорометра для испытуемого раствора;
B — показания флуорометра для контроля к нему;
A_1 — показания флуорометра для стандартного раствора;
B_1 — показания флуорометра для контроля к нему;
100 — объем, до которого доведена навеска, в мл;
25 — объем элюата в мл;
a — навеска испытуемого продукта в г или объем в мл;
v — объем фильтрата, взятый для адсорбции. в мл;
5 — количество элюата, взятое для окисления, в мл;
1000 — пересчет в мг;
100 — пересчет в %

Методы анализа кокарбоксилазы

При получении кокарбоксилазы образуется ряд фосфорных эфиров тиамина:

Трифосфат $C_{12}H_{22}O_{14}N_4SP_4$ М. вес 602,31

Дифосфат $C_{12}H_{21}O_{11}N_4SP_3$ М вес 522,32

Монофосфат $C_{12}H_{20}O_8N_4SP_2$ М. вес 442,34

Кроме того, смесь фосфатов может содержать свободный тиамин и неидентифицированные полифосфаты тиамина.

Это обусловливает чрезвычайные затруднения в анализе указанной смеси. Д. Силипранди и Н. Силипранди (D. Siliprandi, N. Siliprandi, 1954) и Гаудиано с соавторами (Gaudiano a. oth.) предложили методы анализа смеси фосфорных эфиров тиамина, основанные на хроматографическом разделении смеси на бумаге. Этот метод был использован в нашей лаборатории В. И. Колтуновой и с некоторыми изменениями и дополнениями, внесенными ею, применяется в контроле производства препаратов кокарбоксилазы.

Ниже описан метод анализа кокарбоксилазы по принятой прописи.

Полосу хроматографической бумаги размером 9×35 см расчерчивают вдоль на три равные части и на расстоянии 3 см от нижнего края проводят поперечную линию, на которой в центре каждой полосы наносят пятно исследуемого раствора.

Для этого 0,1 г препарата (точная навеска) растворяют в 10 мл воды (раствор 1), отбирают при помощи микропипетки по 0,01 мл полученного раствора и наносят его (в 2 приема по 0,005 мл) на хроматографическую бумагу. Полосу бумаги помещают в камеру для хроматографирования на 20 часов, используя в качестве подвижного растворителя смесь: н-пропанол-вода-1 М ацетатный буферный раствор (pH = 5) в отношении 70 : 20 : 10.

По прошествии указанного времени хроматограмму удаляют из камеры и высушивают на воздухе. Хроматограмму разрезают вдоль на три полосы и среднюю полосу обрызгивают из пульверизатора свежеприготовленной смесью, состоящей из 1 ч. 15% раствора NaOH, 2 ч. 96% этилового спирта и 0,05 ч. 2,5% водного раствора красной кровяной соли. Под влиянием щелочного раствора феррицианида калия тиамин фосфорных эфиров окисляется в тиохром с образованием интенсивной синей флуоресценции. При просмотре в ультрафиолетовом свете флуоресцирующие пятна обрисовывают карандашом и соответственно их местоположению определяют пятна на боковых, не проявленных окислителем, полосах бумаги. Фосфорные эфиры на хроматограмме располагаются в следующем порядке (от места нанесения анализируемого раствора):

Трифосфорный эфир тиамина	$R_f = 0{,}05$
Дифосфорный эфир тиамина	$R_f = 0{,}12$
Монофосфорный эфир тиамина	$R_f = 0{,}20$
Свободный тиамин	$R_f = 0{,}7$

Каждое пятно хроматограммы вырезают, мелко нарезают ножницами и помещают в мерные колбы емкостью 25 мл; в колбы приливают по 5 мл 1 н. раствора соляной кислоты и помещают их на кипящую водяную баню на 60 минут. В течение этого времени колбы с содержимым периодически энергично встряхивают, чтобы добиться полного механического измельчения бумаги и тем самым — полной элюции вещества. По окончании экстракции содержимое колб охлаждают, объем растворов в колбах доводят до метки водой и фильтруют. Из каждого полученного раствора отбирают три пробы по 5 мл в колбы или пробирки с притертыми пробками, туда же прибавляют по 2 мл дистиллированной воды и перемешивают. К двум пробам прибавляют по 1 мл окислительной смеси (см. выше), к третьей (контрольной) — 1 мл 15% раствора NaOH. Пробы встряхивают в течение 1 минуты, после чего прибавляют в каждую по 2 мл раствора перекиси водорода[1].

Интенсивность флуоресценции растворов определяют на флуорометре по сравнению с флуоресценцией стандартного раствора тиаминхлорида.

Содержимое каждого фосфорного эфира тиамина (x) в процентах вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(A - B)\cdot v_1\cdot v_3\cdot c\cdot 100\cdot K}{(A_1 - B_1)\cdot a\cdot v_2\cdot v_4\cdot 1000\cdot 1000},$$

где A — показание прибора для опытного раствора;
B — показание прибора для контроля к опытному раствору;
A_1 — показание прибора для стандартного раствора;
B_1 — показание прибора для контроля к стандартному раствору;
a — навеска в г;
v_1 — объем, в котором растворена навеска, в мл;
v_2 — объем, нанесенный на бумагу, в мл;
v_3 — объем, в котором «растворено» пятно, в мл;
v_4 — объем раствора, взятый для окисления, в мл;
c — количество стандарта, взятое на окисление, в гаммах;
1000 — пересчет в мг;
1000 — пересчет в г;
100 — пересчет в %;
K — коэффициент пересчета на:
монофосфорный эфир = 1,311
дифосфорный эфир = 1,548
трифосфорный эфир = 1,785

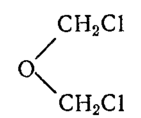
[1] К 90 мл этанола добавляют 0,5 мл 3% раствора перекиси водорода и доводят до 100 мл водой. Спирт предварительно проверяют на отсутствие флуоресценции.

Методы контроля в синтезе витамина B_2

ДИХЛОРМЕТИЛОВЫЙ ЭФИР

$$O\begin{matrix} CH_2Cl \\ CH_2Cl \end{matrix}$$

М вес 114,97



Бесцветная жидкость В воде быстро разлагается с образованием формальдегида:

$$ClCH_2OCH_2Cl + H_2O \rightarrow 2CHOH + 2HCl$$

Уд. вес 1,37. Т кип. 103—105° Растворим в абсолютном алкоголе. Токсичен и требует особого обращения в работе (методы анализа разработаны В А. Девятниным, Л. Н. Кравчиной, Н. М. Стольниковой).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПО ХЛОРУ

Определение общего количества хлора

На аналитических весах взвешивают мерную колбу с притертой пробкой, емкостью 100 мл, в которую внесено приблизительно 20 мл воды (колба должна быть закрыта пробкой). Затем в колбу пипеткой спускают около 0,8 мл дихлорметилового эфира и взвешивают колбу вторично (навеска дихлорметилового эфира не должна превышать 1 г). Содержимое колбы доводят водой до метки (раствор А), тщательно перемешивают и отбирают 10 мл раствора для определения соляной кислоты титрованием 0,1 н. раствором NaOH в присутствии фенолфталеина в качестве индикатора.

Расчет общего количества HCl в процентах (x) производят по формуле:

$$x = \frac{v_1 \cdot 100 \cdot 0,003646\ 100}{a \cdot 10},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;
100 — объем разведения в мл;
0,003646 — эквивалент HCl;
100 — пересчет в %;
a — навеска дихлорметилового эфира в г;
10 — количество раствора, взятое на титрование, в мл.

Определение примеси соляной кислоты

На аналитических весах взвешивают мерную колбу емкостью 50 мл, закрытую притертой нробкой, куда внесено 20—30 мл абсолютного этилового спирта. В колбу пипеткой вносят около 0,8 мл испытуемого образца дихлорметилового эфира, закрывают пробкой и взвешивают вторично. Затем содержимое колбы доводят до метки абсолютным спиртом, перемешивают, отбирают 10 мл и быстро оттитровывают 0,1 н. спиртовым раствором этилата натрия в присутствии фенолфталеина, также приготовленного на абсолютном этиловом спирте.

Титр раствора этилата натрия устанавливают отдельно перед каждым определением по 0,1 н. раствору HCl.

Расчет примеси HCl в образце в процентах (x_1) производят по формуле:

$$x_1 = \frac{v_1 \cdot 50 \cdot 0,003646 \cdot 100}{a_1 \cdot 10},$$

где v_1 — количество точного раствора этилата натрия, пошедшее на титрование, в мл;
50 — объем разведения в мл;
a_1 — навеска дихлорметилового эфира в г (остальные обозначения указаны выше).

Содержание хлора в дихлорметиловом эфире

Процентное содержание хлора находят по разности:

$$c = x - x_1.$$

Содержание дихлорметилового эфира

Процентное содержание дихлорметилового эфира рассчитывают по формуле:

$$x_2 = \frac{c \cdot 100}{61,7},$$

где 61,7 — коэффициент пересчета на теоретическое содержание хлора в дихлорметиловом эфире.

Определение общего количества формальдегида

В основу описываемого метода положен способ йодометрического определения формальдегида, предложенный Ромийном (Romj'n, 1897).

Сущность метода заключается в том, что в присутствии щелочи формальдегид окисляется йодом в муравьиную кислоту. Избыток йода определяют в подкисленном растворе гипосульфитом:

$$J_2 + 2NaOH \rightarrow NaOJ + NaJ + H_2O$$
$$HCOH + NaOJ + NaOH \rightarrow HCOONa + NaJ + H_2O$$
$$NaOJ + NaJ + H_2SO_4 \rightarrow Na_2SO_4 + J_2 + H_2O.$$

Из раствора А (см. стр. 106) отбирают 5 мл в коническую колбу с притертой пробкой, прибавляют 20 мл 0,1 н. раствора J_2 и 10 мл нормального раствора едкого натра. Колбу закрывают пробкой и помещают на 10 минут в темноту, после чего прибавляют 11 мл нормального раствора H_2SO_4 и выделившийся йод оттитровывают 0,1 н. раствором гипосульфита в присутствии 0,5% раствора крахмала.

Расчет общего количества формальдегида в процентах (x_3) производят по формуле:

$$x_3 = \frac{(v_2 - v_3) \cdot 0,001501 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 5},$$

где v_2 — количество точного 0,1 н. раствора йода, взятое на анализ, в мл;
v_3 — количество точного 0,1 н. раствора гипосульфита, пошедшее на титрование, в мл;
0,001501 — количество формальдегида, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора йода, в г;
5 — количество раствора, взятое на титрование, в мл.
Остальные обозначения указаны выше.

Вычисление содержания формальдегида в дихлорметиловом эфире в процентах (x_4) производят по формуле:

$$x_4 = \frac{x_2 \cdot 26,1}{100},$$

где 26,1 — коэффициент пересчета на теоретическое содержание формальдегида в дихлорметиловом эфире.

Примесь формальдегида в дихлорметиловом эфире в процентах (m) находят по разности:

$$m = x_3 - x_4.$$

2-ХЛОРМЕТИЛ-4-НИТРОТОЛУОЛ

ClH_2C, NO_2, H_3C

$C_8H_8O_2ClN$
М. вес 185,6

Легкий кристаллический порошок белого цвета, сильно раздражающий кожу и слизистые оболочки. Токсичен. Т. пл. 61,5°. Нерастворим в холодной воде, умеренно растворим в метаноле, хорошо — в бензоле. В качестве примеси может содержать 2,6-дихлорметил-4-нитротолуол с т. пл. 145° и минеральные кислоты (методы анализа разработаны В. А. Девятниным, Л. Н. Кравчиной, Н. М. Стольниковой).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРА

В основу метода положен способ определения хлора в боковой цепи, предложенный Р. П. Ластовским (1949).

Точную навеску вещества в количестве около 0,2 г помещают в круглодонную колбу емкостью 250 мл, прибавляют 25 мл нормального раствора KOH и 25 мл 96% этилового спирта, колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают в течение 1 часа на кипящей водяной бане. Раствор охлаждают, подкисляют 10 мл HNO_3 (разведенной водой в отношении 1:3), прибавляют 20 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$, 2 мл раствора железоаммониевых квасцов в качестве индикатора и смесь титруют 0,1 н. раствором KCNS до появления розово-желтого окрашивания. Одновременно ставят холостой опыт без испытуемого вещества, показания которого учитывают при расчете (рис. 20).

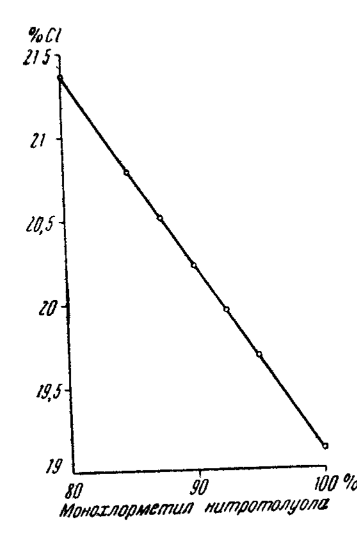


Рис 20 График для расчета примеси дихлорметил-4-нитротолуола в монохлорметил-4-нитротолуоле

Количество хлора в продукте в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x=\frac{(v-v_1)\cdot 0,003546\cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, взятое на анализ, в мл;

v_1 — количество точного 0,1 н. раствора KCNS, пошедшее на титрование, в мл;

0,003546 — количество хлора, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, в г;

100 — пересчет в %;

a — навеска в г.

Примечание Содержание хлора в монохлорметиловом производном — 19,11%

Содержание 2-хлорметил-4-нитротолуола в продукте в процентах (x_1) вычисляют по следующей формуле:

$$x_1=\frac{(v-v_1)\cdot 0,01856\cdot 100}{a},$$

где 0,01856 — количество 2-хлорметил-4-нитротолуола, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, в г.

Остальные обозначения см. выше.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСИ МИНЕРАЛЬНЫХ КИСЛОТ

Точную навеску вещества в количестве около 1 г растворяют в 50 мл метилового спирта в мерной колбе емкостью 50 мл.

а) Для определения примеси HCl 10 мл полученного раствора переносят в коническую колбу, добавляют 5 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$, 1 мл раствора железоаммониевых квасцов и титруют 0,1 н. раствором NH_4CNS до появления розово-желтого окрашивания.

Содержание примеси HCl в процентах (x_2) вычисляют по формуле:

$$x_2=\frac{(v-v_1)\cdot 0,003646\cdot 50\cdot 100}{a\cdot 10},$$

где 50 — объем разведения в мл;

10 — количество раствора, взятое на анализ, в мл;

Остальные обозначения см. выше.

При сокращении формула приобретает значение:

$$x_2=\frac{(v-v_1)\cdot 1,823}{a}.$$

б) Для определения примеси H_2SO_4 отбирают 10 мл приготовленного раствора и титруют в присутствии фенолфталеина 0,1 н. раствором NaOH. Отдельно оттитровывают 10 мл метилового спирта в качестве контроля, и это показание вычитают из показаний опыта.

Израсходованное при титровании количество щелочи соответствует сумме HCl и H_2SO_4 или одной H_2SO_4.

Содержание примеси H_2SO_4 в процентах (x_3) вычисляют по формуле:

$$x_3=\frac{[(v_2-v_3)-(v-v_1)]\ 0,004904\cdot 50\cdot 100}{a\cdot 10},$$

где v_2 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование пробы, в мл;

v_3 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование метилового спирта, в мл;
0,004904 — количество H_2SO_4, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора NaOH, в г.
Остальные обозначения см. выше.

При сокращении формула приобретает следующее значение:

$$x_3 = \frac{[(v_2 - v_3) - (v - v_1)] \cdot 2,452}{a}$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ NO_2-ГРУППЫ

Метод основан на том, что группа NO_2 подвергается восстановлению до NH_2, а первичные амины при взаимодействии с азотистой кислотой определяются по изменению цвета йодкрахмальной бумаги:

$$C_6H_5-NH_2 + NaNO_2 + 2HCl \rightarrow RN_2Cl + NaCl + 2H_2O.$$

Метод разработан на основе способа, предложенного Р. П. Ластовским.

Точную навеску вещества в количестве около 1 г помещают в колбу, снабженную воздушным холодильником, длиной около 1 м, растворяют в 40 мл 80% CH_3COOH, добавляют 20 мл концентрированной HCl (уд. вес 1,19) и 7 г цинковой пыли.

По окончании бурной реакции содержимое колбы нагревают 15 минут на слабом огне, по окончании реакции восстановления раствор охлаждают, фильтруют в мерную колбу емкостью 250 мл, осадок на фильтре промывают 3—4 раза водой, объем раствора в колбе доводят водой до метки. Из полученного раствора после тщательного перемешивания отбирают 50 мл, охлаждают до температуры ниже 10° и титруют 0,1 М раствором $NaNO_2$ по методу диазотирования с выдержкой конца реакции по йодокрахмальной бумаге 5 минут.

Расчет содержания NO_2-группы в процентах (x_4) производят по формуле:

$$x_4 = \frac{v \cdot 0,0046 \cdot 100 \cdot 250}{a \cdot 50},$$

где v — количество точного 0,1 М раствора $NaNO_2$, пошедшее на титрование, в мл;
0,0046 — количество NO_2, соответствующее 1 мл точного 0,1 М раствора $NaNO_2$, в г;
100 — пересчет в %;
250 — объем разведения в мл;
a — навеска в г;
50 — количество испытуемого раствора, взятое на титрование, в мл.

При сокращении формула приобретает следующий вид:

$$x_4 = \frac{v \cdot 2,3}{a}.$$

Примечание 2-хлорметил1-нитротолуол содержит 24,7% NO_2

3,4-КСИЛИДИН

CH_3, CH_3, NH_2

$C_8H_{11}N$
М. вес 121,18

Бесцветный кристаллический продукт, на свету темнеющий, т. пл. 49—50°. Слабо растворим в воде, хорошо—в спирте.

Метод анализа 3,4-ксилидина основан на общеизвестном принципе, что первичные амины при взаимодействии с азотистой кислотой в присутствии соляной кислоты образуют соли диазония (методы анализа разработаны В. А. Девятниным, Л. Н. Кравчиной, Н. М. Стольниковой).

При реакции диазотирования берут избыток минеральной кислоты против теоретически необходимого количества, чтобы устранить побочную реакцию образования диазо-амино и амино-азосоединений, получающихся в результате взаимодействия соли диазония с еще непрореагировавшим с азотистой кислотой амином. Диазо-

тирование проводят при охлаждении раствора. В присутствии бромистого калия скорость диазотирования сильно возрастает (Р. П. Ластовский, 1949).

УСТАНОВКА ТИТРА РАСТВОРА НИТРИТА НАТРИЯ

В толстостенный стакан емкостью 500 мл вносят 25 мл 0,1 *M* раствора сульфаниловой кислоты, 175 мл воды и 25 мл HCl (уд. вес 1,19). Раствор охлаждают (температура раствора должна быть ниже 10°) и титруют приготовленным раствором нитрита натрия, прибавляя его медленно, небольшими порциями, при постоянном помешивании содержимого стакана стеклянной палочкой. Конец реакции устанавливают следующим образом: после прибавления очередной порции раствора нитрита натрия стеклянной палочкой наносят каплю испытуемого раствора на полоску йодокрахмальной бумаги. Если в центре капли не появится синее пятно, прибавляют новую порцию нитрита натрия. Если же пятно появится, наносят вторую и затем третью каплю раствора на бумагу, и если все они дают побурение йодокрахмальной бумаги, раствор оставляют стоять в покое в течение 5 минут. Вторичное появление пятна через 5 минут служит признаком конца титрования.

Первое титрование считается ориентировочным. Испытание на йодокрахмальной бумаге производят после добавления каждой новой порции нитрита. При втором титровании прибавляют нитрита натрия на 0,5—1 мл меньше, чем при ориентировочном титровании, и продолжают титрование, прибавляя его по 1 капле и производя пробу на йодокрахмальной бумаге после прибавления каждой капли.

Такое титрование повторяют 2—3 раза.

Коэффициент поправки к титру нитрита вычисляют по формуле:

$$K = \frac{25}{a},$$

где a — количество раствора нитрита натрия, пошедшее на титрование 25 мл 0,1 *M* раствора сульфаниловой кислоты, в мл.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

Точную навеску ксилидина в количестве около 0,25 г переносят в стакан, растворяют в 2 мл HCl, разведенной водой в отношении 1:1, прибавляют 23 мл воды и 1,5 мл нормального раствора KBr, смесь охлаждают льдом до 6—8° и титруют 0,1 *M* раствором нитрита натрия, как описано выше.

Расчет процентного содержания 3,4-ксилидина в препарате (x) производят по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0{,}012118 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 *M* раствора $NaNO_2$, пошедшее на титрование, в мл;
0,012118 — количество 3,4-ксилидина, соответствующее 1 мл точного 0,1 *M* раствора $NaNO_2$, в г;
100 — пересчет в %;
a — навеска в г.

Недостаточно очищенные растворы 3,4-ксилидина могут содержать в качестве загрязнений некоторое количество аммиака.

Определение примеси аммиака производят, как указано в следующем пункте.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСИ АММИАКА В РАСТВОРАХ 3,4-КСИЛИДИНА

Измеряют объем испытуемой смеси и фильтруют через сухой взвешенный фильтр. Кристаллы на фильтре подсушивают и устанавливают их вес.

10—20 мл фильтрата после удаления кристаллов ксилидина титруют 0,1 н. раствором HCl в присутствии 2—3 капель метилового оранжевого.

Содержание примеси аммиака в испытуемом растворе в граммах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0{,}0017 \cdot v_1}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора HCl, пошедшее на титрование, в мл;
0,0017 — количество NH_3, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора HCl, в г;

8*

v_1 — объем испытуемого раствора в мл;
a — количество фильтрата, взятое на анализ, в мл.

3,4-ксилидин в качестве примеси может содержать также 3,4,5,-триметиламиноазобензол. В синтетической лаборатории ВНИВИ В. М. Березовским и Л. И. Стрельчунас разработан способ определения примеси 3,4,5-триметиламиноазобензола, основанный на том, что при наличии примеси температура расплавления 3,4-ксилидина снижается пропорционально количеству 3,4,5-триметиламиноазобензола. Ниже излагается этот способ.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ 3,4-КСИЛИДИНА В СМЕСИ ПО ТЕМПЕРАТУРЕ ЗАСТЫВАНИЯ

Применяемый для этого определения прибор состоит из пробирки диаметром 18 мм, длиной 63 мм, впаянной в другую пробирку диаметром 38 мм, длиной 75 мм. Между пробирками создан вакуум.

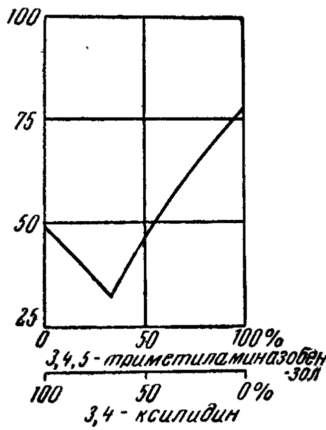


Рис. 21. Диаграмма плавкости смеси 3,4,5-триметиламиноазобензола и 3,4-ксилидина.

Около 5 г вещества вносят во внутреннюю пробирку и нагревают прибор, расплавляя вещество. Опускают термометр в продукт таким образом, чтобы ртутный резервуар находился в середине расплавленной массы. Прибор с содержимым охлаждают на воздухе до температуры, на 5—10° ниже ожидаемой температуры застывания. Чтобы вызвать кристаллизацию, слегка потирают стенки пробирки термометром. После начала кристаллизации медленными колебательными движениями термометра перемешивают вещество для лучшей теплоотдачи у ртутного шарика термометра: температура начинает подниматься. Наибольшая температура, остающаяся некоторое время постоянной, отмечается как температура застывания.

Производят два определения и берут среднее значение. По найденной температуре застывания определяют по графику плавкости (рис. 21) процентное содержание 3,4-ксилидина в анализируемом продукте.

РАСТВОР ЭЛЕКТРОЛИТА
(после электролитического восстановления 3,4-ксилидина)

Методы анализа жидкости из электролизера после электролитического восстановления 3,4-ксилидина разработаны в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ В. А. Девятниным, Л. Н. Кравчиной и Н. М. Стольниковой.

Анализ электролита предусматривает следующие определения:

а) определение содержания 3,4-ксилидина в растворе;
б) определение серной кислоты;
в) определение аммиака.

Образец испытуемого электролита подготавливают к анализу следующим образом: измеряют объем жидкости и фильтруют через высушенный до постоянного веса и взвешенный фильтр. Если в электролите содержатся кристаллы, 3,4-ксилидина, их собирают на фильтре, подсушивают на воздухе, и, взвешивая фильтр с кристаллами, устанавливают вес кристаллического ксилидина.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 3,4-КСИЛИДИНА

Метод основан на принципе, изложенном при определении ксилидина.

Для анализа отбирают 10—20 мл фильтрата, прибавляют 25 мл воды, 1,5 мл нормального раствора бромистого калия и 2 мл HCl (разведенной в отношении 1 : 1). Титрование производят 0,1 *M* раствором $NaNO_2$, как указано выше.

Расчет содержания ксилидина в растворе (x) производят по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0{,}012118 \cdot v_1}{a},$$

где v — количество точного 0,1 М раствора $NaNO_2$, пошедшее на титрование, в мл;
0,012118 — количество ксилидина, соответствующее 1 мл точного 0,1 М раствора $NaNO_2$, в г;
v_1 — пересчет на объем испытуемого раствора в мл;
a — количество фильтрата, взятое на анализ, в мл.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОЙ СЕРНОЙ КИСЛОТЫ

К 10 мл фильтрата прибавляют 4—5 капель 1% спиртового раствора бромтимолового синего и титруют 0,1 н. раствором NaOH до появления голубого окрашивания.

Расчет содержания свободной серной кислоты в растворе (x) производят по фомуле:

$$x = \frac{v_2 \cdot 0{,}004904 \cdot v_1}{a},$$

где v_2 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;
0,004904 — количество H_2SO_4, соответствующее 1 мл точного 0;1 н. раствора NaOH, в г;
v_1 и a — см. выше.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСИ АММИАКА В ВИДЕ АММОНИЙНОЙ СОЛИ

В основу метода положена реакция образования уротропина из аммонийных солей в присутствии формальдегида. Освобождающийся анион SO_4 или Cl оттитровывается щелочью. Реакция протекает количественно по уравнению:

$$6HCOH + 4NH_4Cl \rightarrow (CH_2)_6N_4 + 4HCl + 6H_2O.$$

Этот метод описан в IX издании Госфармакопеи СССР. В химико-аналитической лаборатории ВНИВИ он приспособлен к определению аммиака в электролите.

К 10 мл фильтрата прибавляют 1 мл 35—40% раствора формальдегида, 1 мл воды и сильно встряхивают для разложения аммонийных солей с образованием уротропина и свободной кислоты и титруют в присутствии 4—5 капель 1% спиртового раствора бромтимолового

синего 0,1 н. раствором NaOH. Из полученного показания вычитают результат определения свободной серной кислоты.

Расчет содержания аммиака в аммонийной соли, присутствующей в электролите (x) производят по формуле:

$$x = \frac{(v_3 - v_2) \cdot 0{,}0017032 \cdot v_1}{a},$$

где v_3 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;
0,0017032 — количество аммиака, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;
v_1, v_2 и a — см. выше.

БАРБИТУРОВАЯ КИСЛОТА

(малонил-мочевина)

$C_4H_4O_3N_2$
М. вес 128,09

Белый кристаллический порошок. Кристаллизуется с двумя молекулами H_2O из воды. При нагревании разлагается. Не имеет характерной температуры плавления. Растворима в горячей воде и плохо растворима в холодной.

Методы анализа разработаны в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ В. А. Девятниным, Л. Н. Кравчиной и Л. А. Михайловой и включают качественные определения и количественный анализ.

РЕАКЦИЯ ИДЕНТИЧНОСТИ

Цветная реакция

Реакция основана на образовании под действием нитрита натрия на барбитуровую кислоту натриевой соли виолуровой кислоты, реагирующей с закисными

лями железа с образованием интенсивного окрашивания (Торп и Уайтли, 1937).

10—20 мг барбитуровой кислоты растворяют в пробирке в 3—5 мл горячей воды, охлаждают и нейтрализуют кристаллическим углекислым натрием. К нейтральному раствору прибавляют несколько кристалликов азотистокислого натрия и 1—2 капли 5—10% раствора уксусной кислоты. Смесь подогревают; при наличии барбитуровой кислоты сразу или через некоторое время появляется красное окрашивание. К раствору добавляют 1—2 капли 5% раствора сернокислого закисного железа, раствор приобретает интенсивную синюю окраску. Диалкилбарбитуровая кислота этой реакции не дает.

Примечание. Маточные растворы рибофлавина, содержащие примесь барбитуровой кислоты, необходимо предварительно разводить водой в отношении 1 : 10 или даже 1 : 50. Красная окраска реакции появляется не сразу и иногда имеет другой оттеиок, а при добавлении раствора закисного железа приобретает густо-зеленый цвет. Поэтому в маточниках рибофлавина удобнее пользоваться реакцией осаждения.

Реакция осаждения

К водному раствору барбитуровой кислоты добавляют 5% водный раствор уксуснокислой ртути, выпадает обильный хлопьевидный осадок барбитурата ртути.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОЙ БАРБИТУРОВОЙ КИСЛОТЫ

Точную навеску барбитуровой кислоты в количестве около 0,5 г помещают в мерную колбу емкостью 50 мл, растворяют в горячей воде и по охлаждении раствор доводят водой до метки. Отбирают 10 мл полученного раствора и титруют 0,1 н. раствором NaOH в присутствии фенолфталеина до появления бледно-розового окрашивания.

Вычисление процентного содержания свободной барбитуровой кислоты в препарате (x) производят по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0,012809 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;

0,012809 — количество барбитуровой кислоты, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;

100 — пересчет в %;

a — навеска вещества, взятая на титрование, в г с учетом принятого разведения.

К-СОЛЬ D-АРАБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

```
        H    OH  OH
        |    |   |
KOOC — C  —  C — C — CH2OH
        |    |   |
        OH   H   H
```

$C_5H_9O_6K$
М. вес 204,22

Белый или серовато-белый кристаллический порошок, растворимый в воде.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСИ ОКСАЛАТА КАЛИЯ

Точную навеску арабоната в количестве около 0,5 г помещают в стакан емкостью 200 мл, растворяют в 100 мл теплой воды, прибавляют 2 мл концентрированной HCl (уд. вес 1,19) и нагревают до кипения. Горячий раствор подщелачивают концентрированным раствором аммиака, предварительно внеся в испытуемый раствор 1—2 капли фенолфталеина, затем прибавляют 10 мл горячего насыщенного раствора $CaCl_2$, перемешивают и помещают на 2 часа в кипящую водяную баню, затем охлаждают и осадок оксалата кальция фильтруют через бумажный фильтр. Осадок на фильтре промывают горячей водой до исчезновения реакции на кальций (проба с раствором щавелевой кислоты), под воронку подставляют чистую колбу, конус фильтра прокалывают иглой, смывают осадок с фильтра горячей водой и тщательно промывают фильтр. К фильтрату добавляют 30 мл 20% раствора H_2SO_4, содержимое колбы перемешивают и после растворения осадка оксалата кальция нагревают на электроплитке и горячий раствор титруют 0,1 н. раствором $KMnO_4$ до появления розового окрашивания.

Процентное содержание оксалата калия в арабонате (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0{,}00831 \cdot 100}{a},$$

где 0,00831 — количество $K_2C_2O_4$, отвечающее 1 мл точного 0,1 н. раствора $KMnO_4$, в г;
v — количество точного 0,1 н. раствора $KMnO_4$, пошедшее на титрование, в мл;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

D-АРАБОНАТ КАЛЬЦИЯ

COOCa$^{1}/_{2}$
|
HOCH
|
HCOH
|
HCOH
|
CH$_2$OH

$C_{10}H_{18}O_{12}Ca \cdot 5H_2O$
Экв. вес 230,11

Бесцветные кристаллы. Кристаллизуется с 5 молекулами воды (для 2 молекул арабоновой кислоты). 1 ч. растворяется в 72 ч. воды при 12°. В качестве примеси может содержать арабонат калия.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

(по прописи Л. И. Стрельчунас) [1]

Точную навеску арабоната кальция в количестве около 0,5 г помещают в стакан емкостью 250 мл, прибавляют 2 мл концентрированной HCl (уд. вес 1,19) и 100 мл воды. Смесь нагревают до кипения, подщелачивают 25% раствором аммиака, предварительно добавив 1—2 капли раствора фенолфталеина, и при перемешивании вливают 10 мл горячего насыщенного раствора щавелевокислого аммония. Смесь нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 часов, фильтруют через плотный фильтр, осадок на фильтре промывают теплой водой

[1] Синтетическая лаборатория ВНИВИ.

до отсутствия в фильтрате реакции на щавелевую кислоту (с раствором $CaCl_2$). Затем конус фильтра прокалывают иглой, смывают осадок с фильтра горячей водой в стакан и приливают 30 мл 20% раствора H_2SO_4. Раствор нагревают до 60° и титруют 0,1 н. раствором $KMnO_4$ до появления розового окрашивания.

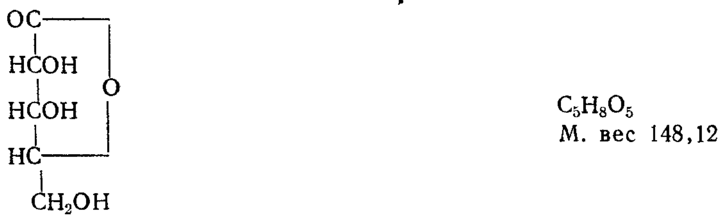
Вычисление процентного содержания арабоната кальция в препарате (x) производят по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0{,}023011 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора $KMnO_4$, пошедшее на титрование, в мл;
0,023011 — количество арабоната кальция, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора $KMnO_4$, в г;
100 — пересчет в %;
a — навеска в г.

Примечание. D-арабонат кальция содержит 8,7% Ca.

D-РИБОНО-γ-ЛАКТОН



Сиропообразная жидкость бледно-желтого цвета или стекловидная масса. Т. пл. 78—80°. Растворим в воде и спирте, трудно—в этилацетате.

$[\alpha]_D^{20} + 18{,}4°$ (для раствора 5 г/100 мл воды).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ СВОБОДНОЙ РИБОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЛАКТОНА

Метод основан на том, что при осторожном титровании щелочью на холоду D-рибоно-γ-лактона свободная рибоновая кислота оттитровывается, тогда как лактон может быть оттитрован только после размыкания кольца под влиянием нагревания (Мейер, 1935).

Точную навеску испытуемого вещества (0,1—0,2 г твердого продукта или 10—20 мл раствора) вносят в коническую колбу, растворяют в воде, прибавляют 1—2 капли фенолфталеина и осторожно (по каплям) титруют 0,1 н. раствором NaOH до первого появления бледно-розового окрашивания. При взбалтывании раствора окраска через некоторое время исчезает. Отмеченное количество щелочи расходуется на титрование свободной рибоновой кислоты, имеющейся в растворе в качестве примеси. После первого появления розового окрашивания испытуемый раствор нагревают до кипения и продолжают титровать почти кипящий раствор щелочью до появления неисчезающего розового окрашивания. Нагревание повторяют еще раз в конце титрования. Количество миллилитров щелочи, пошедшее на продолжение (после нагревания) титрования, соответствует количеству рибоновой кислоты, находящейся в веществе в форме лактона.

Расчет процентного содержания свободной рибоновой кислоты, находящейся в рибонолактоне (x_1) производят по формуле:

$$x_1 = \frac{v \cdot 0,016608 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на первое (холодное) титрование, в мл;
0,016608 — количество рибоновой кислоты, отвечающее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

Расчет процентного содержания рибоновой кислоты, находящейся в испытуемом веществе в форме лактона (x_2), производят по формуле:

$$x_2 = \frac{v_1 \cdot 0,0148 \cdot 100}{a},$$

где v_1 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на дотитровывание испытуемого раствора после нагревания, в мл;
0,0148 — количество рибонолактона, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г.
Остальные обозначения см. выше.

АМАЛЬГАМА НАТРИЯ

(метод анализа разработан в синтетической лаборатории ВНИВИ В. М. Березовским и Л. И. Стрельчунас)

Пробу амальгамы натрия высушивают фильтровальной бумагой и отбирают навеску в количестве 10 г в коническую колбу емкостью 100 мл. Навеску заливают 20 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4 (из бюретки или пипетки), добавляют несколько капель метилового оранжевого и содержимое колбы нагревают в течение 5—10 минут. Если окраска смеси переходит в желтую, к раствору добавляют еще 1—2 капли индикатора; при отсутствии кислой реакции прибавляют еще 5 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4. После разложения амальгамы (на что указывают наличие окраски и отсутствие пузырьков водорода в растворе) избыток кислоты оттитровывают 0,1 н. раствором NaOH. Параллельно оттитровывают щелочью точно такое же количество кислоты, которое было добавлено к испытуемой пробе.

Расчет процентного содержания натрия в амальгаме (x) производят по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0,0023 \cdot 100}{a},$$

где v — количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование холостой пробы, в мл;
v_1 — то же для испытуемой пробы;
0,0023 — количество Na, соответствующее 0,1 н. раствора H_2SO_4, в г;
a — навеска амальгамы в г;
100 — пересчет в %.

D-ГЛЮКОЗА

$CH_2OH(CHOH)_4-C\langle^{O}_{H} \cdot H_2O$ — $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$

М. вес 198,17

Бесцветные кристаллы или белый мелкокристаллический порошок без запаха, сладкого вкуса. Растворим в 1,5 ч. теплой воды и 60 ч. теплого этанола. Нерастворим в эфире. 10% раствор предварительно высушенный при 100—105° до постоянного веса глюкозы после прибавления 1—2 капель раствора аммиака должен иметь удельное вращение от +51 до 53°.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

Применяемые методы общеизвестны и основаны на способности глюкозы (как и других редуцирующих сахаров) восстанавливать окись меди до закиси. Восстановление протекает в стехиометрическом отношении, и по количеству восстановленной меди можно рассчитать количество восстанавливающего сахара.

Микрометод Бертрана

3 мл испытуемого раствора помещают в пробирку, прибавляют 3 мл раствора Фелинга I и 3 мл раствора Фелинга II. Пробирку погружают в кипящую водяную баню и кипятят в течение 6 минут, после чего содержимое пробирки быстро охлаждают струей холодной воды.

Охлажденную жидкость фильтруют через асбестовый фильтр, помещенный в трубку Аллина, в колбу для отсасывания, не перенося осадка закиси меди на фильтр. Осадок в пробирке дважды промывают горячей водой, после чего колбу для отсасывания заменяют чистой колбой; а оставшийся в пробирке осадок растворяют с помощью 3—5 мл раствора сернокислой окиси железа.

Раствор сливают на асбестовый фильтр, отсасывают, пробирку и фильтр промывают дважды холодной водой, полученный раствор вместе с промывной жидкостью титруют раствором перманганата калия до появления розового окрашивания.

Расчет процентного содержания глюкозы (сахара) в испытуемом растворе (x) производят по формуле:

$$x = \frac{c \cdot 100}{v},$$

где c — найденное по таблице (см. табл. 3) количество миллиграммов глюкозы в пересчете на г;
v — разведение навески в мл;
100 — пересчет в %.

Таблица 3

Расчет глюкозы по микрометоду Бертрана

(число миллилитров раствора $KMnO_4$ соответствует количеству меди в мг)

Cu	Глюкоза	Cu	Глюкоза	Cu	Глюкоза
0,55	0,10	3,00	1,30	7,10	3,50
0,80	0,20	3,20	1,40	8,00	4,00
1,00	0,30	3,40	1,50	9,00	4,50
1,15	0,40	3,60	1,60	9,95	5,00
1,35	0,50	3,80	1,70	10,80	5,50
1,60	0,60	4,00	1,80	11,90	6,00
1,80	0,70	4,15	1,90	12,80	6,50
2,00	0,80	4,30	2,00	13,90	7,00
2,20	0,90	5,00	2,25	14,90	7,50
2,40	1,00	5,30	2,50	15,90	8,00
2,60	1,10	5,95	2,75	16,90	8,50
2,80	1,20	6,20	3,00	17,80	9,00

Макрометод Бертрана

Точную навеску исследуемого сахара в количестве 0,7—0,8 г растворяют в воде в мерной колбе емкостью 100 мл. Оттуда после приведения раствора к объему и тщательного перемешивания отбирают 10 мл в коническую колбу емкостью 100—200 мл, прибавляют 20 мл раствора Фелинга I и 20 мл раствора Фелинга II и кипятят на асбестовой сетке в течение 2 минут. После этого раствор в горячем состоянии фильтруют при слабом разрежении через трубку Аллина, в которую вложен слой промытого асбеста. Осадок закиси меди на фильтр не переносят. Осадок в колбе и на фильтре промывают несколько раз горячей водой, фильтрат и промывные воды из колбы для отсасывания выливают, колбу хорошо ополаскивают водой. Осадок в конической колбе растворяют при помощи 20—25 мл раствора железоаммониевых квасцов или раствора сернокислой окиси железа; по растворении осадка зеленоватый раствор фильтруют через трубку Аллина в ту же колбу для отсасывания, фильтр хорошо промывают холодной водой; полученный раствор

вместе с промывной водой оттитровывают 0,1 н. раствором $KMnO_4$ до появления бледно-розового окрашивания.

Расчет содержания сахара производят следующим образом: вначале вычисляют количество образовавшейся закиси меди по формуле:

$$b = a \cdot 6{,}357,$$

где b — количество закиси меди в мг;
a — количество точного 0,1 н. раствора $KMnO_4$, пошедшее на титрование, в мл;
6,357 — постоянный коэффициент.

Количеству меди в мг (b) будет отвечать определенное количество глюкозы в мг (c), что находят, пользуясь специальной таблицей (табл. 4).

Расчет процентного содержания глюкозы производят по формуле, приведенной выше.

Таблица 4

Пересчет миллиграммов меди на миллиграммы глюкозы по макрометоду Бертрана

Cu	Глюкоза	Cu	Глюкоза	Cu	Глюкоза	Cu	Глюкоза	Cu	Глюкоза
20,4	10	60,9	31	98,9	52	134,7	73	168,3	94
22,4	11	62,8	32	100,6	53	136,3	74	169,9	95
24,2	12	64,6	33	102,3	54	137,9	75	171,5	96
26,3	13	66,5	34	104,1	55	139,6	76	173,1	97
28,3	14	68,3	35	105,8	56	141,2	77	174,6	98
30,2	15	70,1	36	107,6	57	142,8	78	176,2	99
32,2	16	72,0	37	109,3	58	144,5	79	177,8	100
34,2	17	73,8	38	111,1	59	146,1	80		
36,2	18	75,7	39	112,8	60	147,7	81		
38,1	19	77,5	40	114,5	61	149,3	82		
40,1	20	79,3	41	116,2	62	150,9	83		
42,0	21	81,1	42	117,9	63	152,5	84		
43,9	22	82,9	43	119,6	64	154,0	85		
45,8	23	84,7	44	121,3	65	155,6	86		
47,7	24	86,4	45	123,0	66	157,2	87		
49,6	25	88,2	46	124,7	67	158,8	88		
51,5	26	90,0	47	126,4	68	160,4	89		
53,4	27	91,8	48	128,1	69	162,0	90		
55,3	28	93,6	49	129,8	70	163,6	91		
57,2	29	95,4	50	131,4	71	165,2	92		
59,1	30	97,1	51	133,1	72	166,8	93		

D-РИБОЗА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ РИБОЗЫ (С ПРИМЕСЬЮ АРАБИНОЗЫ)

Производят, как указано в предыдущем разделе, используя для анализа точно 1 мл раствора, и рассчитывают по специальной таблице (табл. 5).

Таблица 5

Расчет арабинозы по количеству меди в миллиграммах (интерполироваио по Бертраиу)

Арабиноза	Медь	Арабиноза	Медь	Арабиноза	Медь	Арабиноза	Медь	Арабиноза	Медь
10	21,2	30	62,0	50	100,6	70	137,5	90	172,7
11	23,3	31	64,0	51	102,5	71	139,3	91	174,0
12	25,3	32	65,9	52	104,3	72	141,1	92	176,1
13	27,4	33	67,9	53	106,2	73	142,8	93	177,8
14	29,4	34	69,8	54	108,1	74	144,6	94	179,5
15	31,5	35	71,8	55	110,0	75	146,4	95	181,3
16	33,6	36	73,7	56	111,8	76	148,2	96	183,0
17	35,7	37	75,7	57	113,7	77	150,0	97	184,7
18	37,7	38	77,6	58	115,6	78	151,7	98	186,4
19	39,8	39	79,6	59	117,4	79	153,5	99	188,1
20	41,9	40	81,5	60	119,3	80	155,3	100	189,8
21	43,9	41	83,4	61	121,1	81	157,0		
22	45,9	42	85,3	62	122,9	82	158,9		
23	47,9	43	87,2	63	124,8	83	160,5		
24	49,9	44	89,1	64	126,6	84	162,3		
25	52,0	45	91,0	65	128,4	85	164,0		
26	54,0	46	93,0	66	130,2	86	165,7		
27	56,0	47	94,9	67	132,0	87	167,5		
28	58,0	48	96,8	68	133,9	88	169,2		
29	60,0	49	98,7	69	135,7	89	171,0		

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ D-РИБОНО-γ-ЛАКТОНА И СВОБОДНОЙ РИБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

2 мл раствора смешивают с 10—20 мл воды и проводят определение, как указано в методе анализа D-рибоно-γ-лактона.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСИ СУЛЬФАТА НАТРИЯ В СГУЩЕННОМ РАСТВОРЕ САХАРА

3 мл испытуемого раствора помещают в стакан емкостью 50 мл, прибавляют 7 мл воды и 0,1 мл концентрированной HCl (уд. вес 1,19). Смесь доводят до кипения,

прибавляют 10 мл 5% кипящего раствора хлористого бария и нагревают 30 минут на кипящей водяной бане. Осадок отфильтровывают, промывают на фильтре горячей водой до отсутствия реакции на хлор. Фильтр с промытым осадком помещают в прокаленный и взвешенный тигель, сжигают и обугливают. Остаток в тигле смачивают несколькими каплями серной кислоты и вновь обугливают и озоляют до постоянного веса.

Содержание сульфата натрия в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(g_2 - g_1) \cdot 0{,}6086 \cdot 100}{a},$$

где g_2 — вес тигля с прокаленным остатком в г;
g_1 — вес пустого тигля в г;
0,6086 — постоянный коэффициент;
— количество раствора, взятое на анализ, в мл;
100 — пересчет в %.

3,4-КСИЛИДИН-N-D-РИБОПИРАНОЗИД

(Структурная формула: H_3C, H_3C — бензольное кольцо — N(H) — C(H) — C(OH)(H) — C(OH)(H) — C(OH)(H) — CH(H), кольцо через O)

$C_{13}H_{19}O_4N$
М. вес 253,29

Бесцветные кристаллы, трудно растворимые в воде Существует в виде комплексной соли с сульфатом натрия, состава $5CH_3H_{19}NO_4$ $3Na_2SO_4$ $4H_2O$, м. вес 1763. Теоретическое содержаиие рибозы 42,54%.

Методы анализа рибопиранозида разработаны в синтетической лаборатории ВНИВИ В. М. Березовским и Л. И. Стрельчунас и основаны на йодометрическом определении восстанавливающих сахаров.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ПРОДУКТЕ

Навеску испытуемого вещества, содержащую от 20 до 38 мг сахара, помещают в коническую колбу емкостью 200 мл, растворяют в 20 мл воды и нагревают до кипения. К раствору приливают 10 мл раствора Фелинга I и 10 мл раствора Фелинга II. Колбу закрывают часовым стеклом и содержимое ее кипятят точно 10 минут. Смесь охлаждают, к ней добавляют 20 мл свежеприготовленного 10% раствора йодистого калия и 20 мл 3 н раствора H_2SO_4. Выделившийся йод тотчас титруют 0,1 н. раствором гипосульфита натрия, применяя в качестве индикатора 2 мл 0,5% раствора крахмала.

Одновременно оттитровывают раствором гипосульфита натрия смесь из 10 мл раствора Фелинга I и 10 мл раствора Фелинга II.

Расчет процентного содержания рибозы в соли (x) производят по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1)\ 3{,}37 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшее на титрование холостой пробы, в мл;
v_1 — то же для испытуемого;
3,37 — постоянный коэффициент,
100 — пересчет в %;
a — навеска в г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В МАТОЧНИКАХ

Пробу маточника, содержащую от 20 до 40 мг сахара, отвешивают в коническую колбу емкостью 200 мл, смешивают с растворами Фелига и проводят определение, как описано выше.

Определение может быть проведено также и по методу Бертрана.

D-РИБАМИН

3,4-ксилил-D-рибамин

(Структурная формула: CH_2OH — HOCH — HOCH — HOCH — CH_2 — NH — бензольное кольцо с двумя H_3C)

$C_{13}H_{21}O_4N$
М. вес 255,3

9*

Кристаллический бесцветный порошок. Т. пл. 140—142°. Умеренно растворим в горячей и плохо в холодной воде. Растворяется в горячем этиловом и бутиловом спиртах.

В основу анализа D-рибамина положена реакция нитрозирования, протекающая между ароматическими аминами и нитритом натрия в солянокислой среде. Реакция протекает количественно с образованием нитрозаминов. Конец реакции определяется по появлению синего окрашивания на йодокрахмальной бумаге (азотистая кислота реагирует с йодистым калием, содержащимся в йодокрахмальной бумаге, окисляет его, выделяя свободный йод, который дает с крахмалом синее окрашивание).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ПРОДУКТЕ

(метод разработан В. А. Девятниным, Л. Н. Кравчиной, Н. М. Стольниковой)

Точную навеску препарата в количестве около 0,2 г помещают в стакан, смачивают 0,1 мл концентрированной HCl (уд. вес 1,19), прибавляют 10 мл воды и после полного растворения навески содержимое стакана охлаждают до 10° и титруют 0,1 *М* раствором $NaNO_2$, как описано при анализе 3,4-ксилидина.

Параллельно ставят контрольный опыт на чувствительность йодокрахмальной бумаги, оттитровывая 0,1 мл HCl с 10 мл воды раствором нитрита натрия.

Расчет процентного содержания D-рибамина (x) производят по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0{,}02553 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 *М* раствора $NaNO_2$, пошедшее на титрование испытуемой пробы, в мл;

v_1 — количество точного 0,1 *М* раствора $NaNO_2$, пошедшее на титрование контрольного опыта, в мл;

0,02553 — количество D-рибамина, соответствующее 1 мл 0,1 *М* раствора $NaNO_2$, в г;

100 — пересчет в %;

a — навеска в г.

3, 4-КСИЛИЛ-6-ФЕНИЛАЗО-1-D-РИБАМИН (АЗОРИБАМИН)

$C_{19}H_{25}O_4N_3$

М. вес 359,43

Кристаллический порошок кирпично-красного цвета. В воде и бензоле на холоду нерастворим. Растворяется в соляной и уксусной кислотах с образованием интенсивно окрашенных растворов, обесцвечивающихся гидросульфитом натрия. Хорошо растворим в ацетоне. Т. пл. 174—175°.

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЗОРИБАМИНА

Метод разработан в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ В. М. Иосиковой и основан на очистке азорибамина от желтых примесей, извлекаемых бензолом, и колориметрическом определении окрашенного раствора [1].

Из средней пробы испытуемого образца кристаллического продукта отбирают две навески по 20 мг. Одну из них растворяют в мерной колбе емкостью 100 мл в свежеперегнанном сухом ацетоне и доводят раствор ацетоном до метки (раствор А). Другую навеску растворяют в свежеперегнанном сухом бензоле в мерной колбе емкостью 100 мл и доводят бензолом до метки (раствор Б).

Раствор Б после тщательного перемешивания оставляют в покое на 15—20 минут, после чего вновь перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

---

[1] Как показано В. М. Иосиковой, азорибамин хорошо растворяется в ацетоне и нерастворим в холодном бензоле, тогда как сопутствующие азорибамину примеси в нем хорошо растворяются, что позволяет определить их количество.

В кюветы фотоколориметра отбирают по 1 мл полученных растворов А и Б, доводят их до 10 мл соответствующими растворителями. Окраску обоих растворов измеряют со светофильтром $\lambda=470$ mμ. В качестве контроля для установки прибора на нуль пользуются ацетоном (в первом случае) и бензолом (во втором случае).

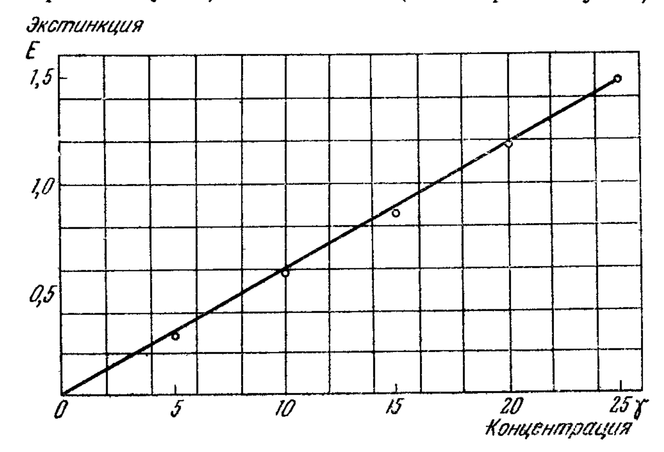


Рис. 22. Калибровочный график для определения азорибамина.

Калибровочный график строят по 100% чистому азорибамину, по кривой находят соответствующее экстинкции измеряемых растворов содержание красящих веществ (рис. 22). Разность между найденным содержанием красящих веществ в растворах А и Б соответствует количеству азорибамина в испытуемом образце.

Расчет процентного содержания азорибамина в образце (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(A - Б)\cdot 100 \cdot v}{a \cdot 1000 \cdot 1000},$$

где A — количество красящих веществ в 1 мл в γ в ацетоновом растворе;
$Б$ — то же в бензольном растворе;
v — объем, до которого доведена навеска, в мл;
100 — пересчет в %;
a — навеска в г;
1000 — пересчет в мг;
1000 — пересчет в г.

ВИТАМИН B_2 (РИБОФЛАВИН)

CH_2OH
HOCH
HOCH
HOCH
CH_2
H_3C N N O
NH
H_3C N
O

Физико-химические свойства рибофлавина

Показатель	Характеристика
Состояние вещества	Желто-оранжевые игольчатые кристаллы (из спирта)
Формула	$C_{17}H_{20}ON_4O_6$
Молекулярный вес	376,38
Температура плавления	Около 282° (разл.)
Растворимость	В воде при 25°— 0,012 г в 100 мл, в этиловом спирте—0,0045 г в 100 мл, в эфире, ацетоне, бензоле, хлороформе нерастворим
Оптическая активность	—114° (в 0,1 н. растворе NaOH)
Окислительно-восстановительный потенциал	—0,21 в pH = 7,0)
Биологическая активность	1 г кристаллического витамина B_2= 400 000 ИЕ
Максимум абсорбции	225, 269, 372, 445 mμ
Флуоресценция	Желтовато-зеленая
Максимум абсорбции флуоресценции	515—645 mμ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ПРЕПАРАТЕ

В основу описываемых методов положен способ, изложенный Рубиным с соавторами (Rubin a. oth., 1945)[1].

[1] Методы определения рибофлавина описаны также в сб.: Методы определения витаминов. Под редакцией В. А. Девятнина, 1954.

Точную навеску препарата в количестве 0,01 г переносят в мерную колбу емкостью 250 мл, растворяют в воде при нагревании и доводят водой до метки. Из полученного раствора отбирают 1 мл в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят водой до метки. В кювету флуорометра переносят 10 мл полученного раствора и измеряют интенсивность его флуоресценции по сравнению со стандартным раствором.

Содержание рибофлавина в процентах в продукте (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{A_1 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 0,4 \cdot 100}{A \cdot 0,01 \cdot 1 \cdot 1000 \cdot 1000} = \frac{A_1 \cdot 100}{A},$$

где A_1 — показание флуорометра для испытуемого раствора;
250 — первое разведение в мл;
100 — второе разведение в мл;
0,4 — концентрация стандарта в γ;
100 — пересчет в %;
A — показание флуорометра для стандартного раствора;
0,01 — навеска в г;
1 — количество раствора, взятое для второго разведения, в мл;
1000 — пересчет в мг;
1000 — пересчет в г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ В ТЕХНИЧЕСКОМ ПРОДУКТЕ

Образцы рибофлавина могут быть загрязнены флуоресцирующими примесями. Обработкой гидросульфитом натрия рибофлавин восстанавливают в лейкофлавин, который утрачивает способность флуоресцировать, тогда как примеси не восстанавливаются. По разности в интенсивности флуоресценции обработанных и необработанных гидросульфитом растворов судят о количестве рибофлавина.

Точную навеску испытуемого продукта в количестве 0,01 г переносят в мерную колбу емкостью 250 мл, растворяют в воде и доводят водой до метки. Если полученный раствор имеет интенсивную флуоресценцию, производят второе разведение. Для этого отбирают 1 мл раствора в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят объем раствора до метки водой. Из полученного раствора отбирают две пробы:

а) 8 мл раствора переносят в кювету для измерения флуоресценции и доводят водой до 10 мл. Содержимое этой кюветы поступает непосредственно на измерение интенсивности флуоресценции;

б) 8 мл переносят в коническую колбу емкостью 50—100 мл, туда же по каплям добавляют 4% раствор перманганата калия до появления неисчезающего розового окрашивания. После этого содержимое колбы оставляют на 10 минут и затем избыток внесенного перманганата удаляют, добавляя по каплям 3% раствор H_2O_2. К содержимому колбы добавляют 0,2 мл раствора хлористого олова и 0,1 мл раствора гидросульфита натрия, после чего содержимое колбы энергично встряхивают в течение 20 минут, а затем количественно переносят в мерную колбу или точно градуированный цилиндр и доводят водой до объема 10 мл. Полученный раствор фильтруют в кювету флуорометра.

Содержимое обеих кювет поступает на измерение флуоресценции.

Примечание Если при окислении перманганатом раствор во второй колбе от прибавления 1 капли перманганата окрашивается в розовый цвет, мешающих измерению флуоресценции примесей в испытуемом растворе не содержится Тогда при расчете принимают во внимание показания флуорометра для первой кюветы, содержимое которой не подвергалось окислению.

Содержание рибофлавина в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{A \cdot 250 \cdot 100 \cdot 10 \cdot 0,4 \cdot 100}{A \cdot 0,01 \cdot 1 \cdot 8 \cdot 1000 \cdot 1000} = \frac{A_1 \cdot 125}{A},$$

где 100 — второе разведение в мл;
10 — третье разведение в мл;
0,01 — навеска в г;
8 — количество раствора, взятое на окисление, в мл;
Остальные обозначения см. выше.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В МАТОЧНИКАХ И ПРОМЫВНЫХ ВОДАХ

1 мл испытуемой жидкости вносят в мерную колбу емкостью 250 мл, объем раствора доводят до метки водой. Из этого раствора отбирают:

а) 1 мл в кювету для измерения флуоресценции и доводят водой до 10 мл;

б) 1 мл в коническую колбу емкостью 50—100 мл, добавляют 7 мл дистиллированной воды и окисляют раствором перманганата, как указано ранее.

Дальнейший ход анализа см. выше.

Содержимое обеих кювет поступает на измерение флуоресценции.

Расчет процентного содержания рибофлавина в испытуемой жидкости (x) производят по формуле:

$$x = \frac{A_1 \cdot 250 \cdot 10 \cdot 0,4 \cdot 100}{A \cdot l_1 \cdot l_2 \cdot 1000 \cdot 1000} = \frac{A_1 \cdot 0,1}{A},$$

где l_1 — количество раствора, взятое для первого разведения, в мл;

l_2 — количество раствора, взятое для окисления, в мл;

Остальные обозначения см. выше.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ ПО IX ГОСФАРМАКОПЕЕ СССР

Около 0,1 г (точная навеска) высушенного при 100° до постоянного веса препарата помещают в колбу Кьельдаля емкостью 200 мл и далее поступают, как указано в анализе ацетонитрила (стр. 67).

1 мл 0,1 н. раствора серной кислоты отвечает 0,009406 г рибофлавина.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В ДРАЖЕ И ТАБЛЕТКАХ

Около 1 г порошка растертых драже или таблеток (точная навеска) растворяют при нагревании в воде, переносят в мерную колбу емкостью 250 мл, охлаждают, доводят до метки водой и фильтруют. Из фильтрата отбирают 5 мл в мерную колбу емкостью 250 мл, доводят объем до метки водой и перемешивают. В две кюветы флуорометра переносят 8—10 мл испытуемого и стан-

дартного рабочего раствора для измерения флуоресценции. Одновременно в другие две кюветы переносят 8—10 мл испытуемого и стандартного рабочего раствора, прибавляют около 0,1 г бикарбоната натрия и гидросульфита натрия для гашения флуоресценции рибофлавина как в стандартном, так и в испытуемом растворе, где остается флуоресценция только посторонних флуоресцирующих веществ.

Результат измерения сравнивают с показанием флуорометра для стандартного рабочего раствора рибофлавина.

Содержание рибофлавина в 1 шт. драже или таблеток в миллиграммах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(A - B) \cdot 0,4 \cdot v \cdot v_2 \cdot d}{(A_1 - B_1) \cdot a \cdot v_1 \cdot 1000},$$

где A — показание флуорометра для испытуемого раствора;

B — показание флуорометра для испытуемого раствора после гашения;

A_1 — показание флуорометра для рабочего стандартного раствора;

B_1 — показание флуорометра для стаидартного раствора после гашения;

0,4 — концентрация стандартного раствора рибофлавина в γ;

a — навеска в г;

v — объем, в котором растворена навеска, в мл;

v_1 — объем, взятый для разведения в мл;

v_2 — объем, взятый после разведения, в мл;

d — средний вес 1 шт. таблеток или драже в г;

a — навеска в г;

1000 — пересчет в мг.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

(метод разработан К. Л. Поволоцкой, Н. И. Зайцевой, Е. П. Скоробогатовой в Институте биохимии имени Баха АН СССР)

В настоящее время известны 4 формы рибофлавина: свободный рибофлавин, мононуклеотид, флавинадениндинуклеотид и прочно связанная с белком форма, воз-

можно также являющаяся нуклеотидом, но не определяемая известными методами.

Описываемый ниже метод позволяет определять общее содержание рибофлавина и раздельно его различные формы.

Определение общего количества рибофлавина

Навеску испытуемого материала тщательно растирают в ступке с небольшим количеством фосфатного буфера (pH=7—8). Растертую массу переносят в колбу с помощью буферного раствора с таким расчетом, чтобы общее разведение соответствовало отношению 1:15 или 1:20. Смесь выдерживают на кипящей водяной бане в течение 40 минут, охлаждают до 30°, проверяют pH и в случае сдвига в кислую зону, что часто наблюдается при работе с кислыми объектами, вновь доводят до 7,8—8,0, после чего к смеси добавляют ферментный препарат (трипсин, панкреатин, клараза и др.) из расчета 30 мг препарата на 1 г сухого вещества навески.

Смесь помещают в термостат и выдерживают в течение 12—20 часов при 37°. В этих условиях отщепляется прочно связанная с белком форма рибофлавина. Смесь доводят водой до определенного объема с таким расчетом, чтобы общее разведение соответствовало отношению 1:25 или 1:30, и фильтруют через складчатый фильтр. Из фильтрата отбирают в колбу 5 мл, добавляют 5 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты, помещают на кипящую водяную баню и выдерживают 10 минут.

Обработка трихлоруксусной кислотой освобождает рибофлавин из его нуклеотидных форм. Вытяжку охлаждают и добавляют 1/4 объема 4 М. раствора K_2HPO_4 с целью доведения pH до 6,0. Затем к вытяжке прибавляют по каплям 4% раствор $KMnO_4$ до тех пор, пока красноватая окраска раствора не перестанет исчезать (обычно это соответствует 0,2—0,5 мл). Вытяжку оставляют на 10 минут в покое, после чего к ней добавляют по каплям 3% раствор H_2O_2 до исчезновения окраски вытяжки. К вытяжке прибавляют 0,2 мл рабочего раствора $SnCl_2$ и 0,1 мл 2,5% раствора гидросульфита натрия. Энергично встряхивают в течение 20 минут. Объем вытяжки доводят до 15 мл и в случае необходимости фильтруют. Фильтрат поступает на измерение флуоресценции.

Вытяжку и стандартный рабочий раствор рибофлавина, приготовленный на трихлоруксусной кислоте, помещают в кюветы флуорометра и интенсивность флуоресценции определяют по шкале гальванометра. Затем в обе пробирки прибавляют по 0,1 г $NaHCO_3$ и около 0,1 г $Na_2S_2O_4$ и вновь производят измерение флуоресценции. Флуоресценция рибофлавина гасится до нуля. В опытных вытяжках остается небольшая флуоресценция, вызываемая посторонними флуоресцирующими веществами, которые сохранились в вытяжках, несмотря на указанную обработку. Тушение флуоресценции рекомендуется проводить 2—3 раза, так как в некоторых случаях оно протекает очень медленно. Для этого к пробам повторно добавляют гидросульфит и вновь измеряют флуоресценцию растворов.

Содержание рибофлавина в γ на 1 г вещества (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(A - B) \cdot 0{,}4 \cdot v}{c \cdot a},$$

где A — показание флуорометра для испытуемого раствора (1-й отсчет);
B — показание флуорометра для испытуемого раствора после гашения (2-й отсчет);
c — показание флуорометра для стандартного раствора, содержащего 0,4 γ рибофлавина, в мл;
0,4 — концентрация стандартного раствора рибофлавина в γ;
a — навеска в г;
v — объем разведения в мл.

Определение кислотногидролизуемого и фосфатазноотщепляемого рибофлавина

Навеску испытуемого вещества тщательно растирают в ступке с небольшим количеством 0,1 н. раствора H_2SO_4 и переносят в колбу, куда добавляют 0,1 н. раствор H_2SO_4 до общего разведения 1:15 или 1:20. Смесь выдерживают на кипящей водяной бане в течение 40 минут, охлаждают до 40°, pH вытяжки доводят насыщенным раствором уксуснокислого натрия до 4,5, прибавляют ферментный препарат (клараза или мицелий пеницилли-

ума) из расчета 30 мг препарата на 1 г сухого вещества навески. Вытяжку помещают в термостат и выдерживают при 37° 12—16 часов. Затем вытяжку доводят водой до такого объема, чтобы общее разведение соответствовало отношению 1 : 25 или 1 : 30 и фильтруют. 8 мл вытяжки обрабатывают раствором перманганата калия, хлористого олова и гидросульфитом натрия так, как описано выше. Интенсивиость флуоресценции измеряют, как описано, с той только разницей, что в качестве стандарта используют рабочий раствор рибофлавина, приготовленный иа воде. Содержание рибофлавина вычисляют по приведенной выше формуле.

Примечание. Измерение флуоресценции вытяжки, подвергнутой только кислотному гидролизу без ферментативной обработки, дает сумму свободной и мононуклеотидной формы рибофлавина.

Вычисление содержания отдельных форм рибофлавина

Общее количество рибофлавина включает прочно связанный с белком рибофлавин+флавинаденин-динуклеотид+мононуклеотид рибофлавина+свободный рибофлавин.

Из результатов, полученных при первом определении, вычитают результаты второго определения; разность составляет содержание прочно связанной с белком формы рибофлавина.

Разность в результатах измерения флуоресценции рибофлавина до и после ферментативной обработки во втором определении составляет содержание кислотноотщепляемого флавинаденин-динуклеотида.

Обработка кислотой вытяжки до ферментативного гидролиза (второе определение) бензиловым спиртом дает возможность определить раздельно свободную и мононуклеотидную форму рибофлавина. Следует иметь в виду, что в некоторых случаях определение истинного количества рибофлавина в естественных объектах может быть достигнуто лишь после автолиза или автоклавирования ткани.

Методы контроля в синтезе витамина B_3 (пантотеновой кислоты)

β-АМИНОПРОПИОНОВАЯ КИСЛОТА (β-АЛАНИН)

$NH_2CH_2CH_2COOH$

$C_3H_7O_2N$
М. вес 89

Белый кристаллический порошок. Т. пл. 200°. Хорошо растворим в воде, трудно растворяется в метиловом, этиловом, изопропиловом спиртах, нерастворим в эфире и ацетоне.

Метод определения качества β-аланина основан на известном методе формольного титрования аминокислот, предложенном еще в 1907 г. Серенсеном (цит. по Н. Н. Иванову, 1935).

Сущность этого метода заключается в том, что аминогруппа аминокислоты понижает кислотную константу ее диссоциации, добавление же формальдегида уничтожает влияние аминогруппы.

$$\begin{array}{c}CH_3\\|\\CH-NH_2\\|\\COOH\end{array} + \begin{array}{c}H\\|\\C=O\\|\\H\end{array} \rightarrow \begin{array}{c}CH_3\\|\\CH-N=CH_2\\|\\COOH\end{array} + H_2O$$

Образующаяся в этой реакции метилен-аминокислота является более сильной кислотой, чем исходный аланин, и может быть оттитрована щелочью по уравнению:

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CH - N = CH_2 \\ | \\ COOH \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} CH_2 \\ | \\ CH - N = CH_2 + H_2O \\ | \\ COONa \end{array}$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

(метод разработан В. А. Девятниным и В. В. Никифоровой в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ)

Точную навеску вещества в количестве 0,3—0,5 г растворяют в 20 мл воды, добавляют 10 мл формольной смеси и титруют 0,5 н. раствором NaOH до появления синего окрашивания, одинакового с окрашиванием контрольной пробы.

Для контрольного определения к 20 мл воды добавляют 10 мл формольной смеси и титруют 0,5 н. раствором NaOH до появления синего окрашивания.

Содержание β-аланина в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v_1 - v_2) \cdot 0,0445 \cdot 100}{a},$$

где v_1 — количество точного 0,5 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование испытуемого вещества, в мл;

v_2 — количество точного 0,5 н. раствора NaOH, пошедшее на контрольное титрование, в мл;

a — навеска в г;

0,0445 — количество β-аланина, соответствующее 1 мл точного 0,5 н раствора NaOH, в г;

100 — пересчет в %.

Аммонийные соли, могущие присутствовать в виде примеси в исследуемом образце, мешают определению β-аланина формольным методом, так как в присутствии щелочи из них выделяется аммиак, обусловливающий образование с формальдегидом уротропина, а освобождающаяся при этом кислота будет титроваться щелочью.

Поэтому если в исследуемом образце имеется примесь аммонийных солей (реакция с реактивом Несслера), то поступают следующим образом.

Точную навеску вещества в количестве 0,3—0,5 г растворяют в небольшом количестве воды, переносят в круглодонную колбу с холодильником Либиха. К форштоссу холодильника присоединяют приемную колбу, куда вносят 20 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4. Приемную колбу соединяют с источником вакуума. В отгоночную колбу быстро вносят 2 мл 0,5 н. раствора NaOH, колбу быстро соединяют с холодильником и при нагревании на водяной бане при 60—70° содержимое колбы отгоняют в вакууме досуха. По окончании отгонки форштосс холодильника слегка ополаскивают водой в приемную колбу и содержимое ее титруют 0,1 н. раствором NaOH в присутствии 2—3 капель метилового красного в качестве индикатора.

Расчет примеси аммонийных солей по азоту в процентах (x_1) производят по формуле:

$$x_1 = \frac{(v_1 - v_2) \cdot 0,0014 \cdot 100}{a},$$

где v_1 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование контрольного опыта, в мл;

v_2 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование содержимого приемника, в мл;

a — навеска в г;

0,0014 — количество азота, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;

100 — пересчет в %.

Остаток в круглодонной отгоночной колбе после удаления аммиака растворяют в 20 мл воды и далее проводят формольное титрование, как описано выше. Содержание общего азота в процентах (x_2) вычисляют по формуле:

$$x_2 = \frac{[(v_1 + 2) - v_2] \cdot 0,007 \cdot 100}{a},$$

где 2 — количество точного 0,5 н. раствора NaOH, добавленное к пробе перед отгонкой аммиака, в мл;

0,007 — количество азота, соответствующее 1 мл точного 0,5 н. раствора NaOH, в г.

Остальные обозначения см. выше.

Содержание β-аланина в процентах в исследуемом образце (x_3) при наличии примеси аммонийных солей вычисляют по формуле:

$$x_3 = \frac{(x_2 - x_1)\cdot 100}{15{,}8},$$

где 15,8 — содержание азота в β-аланине в %.

Остальные обозначения см. выше.

L(+)-ТРЕО-1-(p-НИТРОФЕНИЛ)-2-АМИНОПРОПАНДИОЛ-1,3

$$NO_2-C_6H_4-CH(OH)-CH(NH_2\cdot{}^1/_2H_2SO_4)-CH_2OH$$

Бесцветные кристаллы, т. пл. 226° (разл.). Растворим в воде 1 : 20 при 20°, плохо растворим в этаноле, ацетоне, нерастворим в хлороформе и эфире $[\alpha]_D^{20}$ + 24,2° (5% раствор в воде).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

Для анализа этого соединения В. В. Никифоровой в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ предложен следующий полярографический метод: 0,05—0,055 г вещества (точная навеска) растворяют в этиловом спирте при слабом подогревании, переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, доводят спиртом до метки и перемешивают. Из полученного раствора отбирают 1 мл в эрленмейеровскую колбу, доводят объем спиртом до 10 мл, приливают 1 мл 0,1% водного раствора агара и 9 мл ацетатного буферного раствора (pH=3,0). Полученный раствор

помещают в ячейку полярографа, пропускают 5 минут ток азота и затем при 25° производят съемку полярограммы начиная с 0—0,2 в.

Расчет содержания вещества в процентах (x) производят по формуле:

$$x = \frac{c\cdot v\cdot v_2\cdot 100}{a\cdot v_1\cdot 1000},$$

где c — количество L(+)-треоамина, найденное по калибровочному графику, в мг/мл;
a — навеска в г;
v — объем, в котором растворена навеска, в мл;
v_1 — объем раствора, взятый для снятия полярограммы, в мл;
v_2 — общий объем раствора, взятый для полярографирования, в мл;
1000 — пересчет в г;
100 — пересчет в %.

П о с т р о е н и е к а л и б р о в о ч н о г о г р а ф и к а. Точную навеску треоамина (определенного методом диазотирования и микроэлементарным анализом) в количестве 0,05 г растворяют в спирте, переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, доводят спиртом до метки и перемешивают. Отбирают количества раствора, соответствующие 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,150 мг треоамина, доводят объем раствора в каждой колбе до 10 мл, прибавляют в каждую колбу по 1 мл 0,1% раствора агара, 9 мл ацетатного буферного раствора (pH=3,0) и снимают для каждого раствора полярограмму, как указано выше. Калибровочный график строят, откладывая по оси абсцисс концентрации раствора треоамина в мг/мл, а по оси ординат — соответствующие им высоты волн.

α-ОКСИ-β, β-ДИМЕТИЛ-γ-БУТИРОЛАКТОН

$$(CH_3)_2C-CH(OH)-C(=O)-O-CH_2 \text{ (цикл)}$$

$C_6H_{10}O_3$

М. вес 130

Бесцветное стекловидное вещество. Т. пл. 56—80°, т. кипения 100—110° при 7 мм. Хорошо растворим в воде.

Принцип размыкания лактонов после обработки щелочью был положен В. В. Никифоровой в основу метода количественного определения γ-бутиролактона. Протекающая при этом реакция может быть представлена в следующем виде:

$$\begin{array}{l}(CH_3)_2-C\text{———}CHOH \\ \quad\ \ | \qquad\qquad\ | \\ \quad H_2C \qquad\ CO + NaOH \rightarrow HOCH_2-C(CH_3)_2-CHOH-COONa. \\ \qquad \diagdown O \diagup \end{array}$$

При кипячении γ-бутиролактона со щелочью происходит размыкание лактонного кольца и образуется соответствующая натриевая соль γ-оксикислоты; избыток щелочи, не вступившей в реакцию, обратно оттитровывается соляной кислотой.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

(по прописи В. А. Девятнина и В. В. Никифоровой, химико-аналитическая лаборатория ВНИВИ)

Точную навеску вещества в количестве 0,1—0,15 г, взятую на аналитических весах, растворяют в небольшом количестве воды в эрленмейеровской колбе емкостью 100 мл, прибавляют из бюретки 25 мл 0,1 н. раствора NaOH и нагревают смесь с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 часа. По охлаждении смеси избыток щелочи оттитровывают 0,1 н. раствором HCl в присутствии фенолфталеина в качестве индикатора.

Содержание γ-бутиролактона в веществе в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v_1 - v_2)\cdot 0,013\cdot 100}{a},$$

где v_1 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, взятое в реакцию, в мл;

v_2 — количество точного 0,1 н. раствора HCl, пошедшее на титрование, в мл;

a — навеска в г;

0,013 — количество γ-бутиролактона, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;

100 — пересчет в %.

ВИТАМИН B_3 (ПАНТОТЕНОВАЯ КИСЛОТА)

(α-α-ДИОКСИ-β-β-ДИМЕТИЛ-β-АЛАНИД МАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ)

$$HO-CH_2-\overset{\displaystyle CH_3}{\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}}-CH(OH)-CONH-CH_2-CH_2-COOH$$

Пантотеновая кислота, витамин B_3, участвует в образовании коэнзима А, фермента, имеющего важнейшее значение в реакциях ацилирования в организме и в обмене жирных кислот. Совместное применение пантотеновой кислоты с антибиотиками устраняет их токсическое действие на организм. Широко применяется при поражениях радиоактивными веществами и воспалительных процессах кожи.

Промышленными препаратами пантотеновой кислоты, получаемыми путем синтеза, являются ее соли, глав-

Физико-химические свойства пантотеновой кислоты

Показатель	Характеристика	
	пантотеновая кислота	пантотенат кальция
Состояние вещества	Бледно-желтое масло	Бесцветные кристаллы
Брутто-формула	$C_9H_{17}O_5N$	$(C_{18}H_{32}O_{10}N_2)$ Ca
Молекулярный вес	219,2	476,53
Температура плавления	—	—
Растворимость	Хорошо растворима в воде, этаноле, этилацетате, диоксане, слабо—в эфире и амилалкоголе; нерастворима в бензоле, хлороформе	Хорошо растворим в воде, этаноле, этилацетате, диоксане; нерастворим в ацетоне, хлороформе, бензоле, эфире
Удельное вращение	+ 37,5 (в воде) [1]	+ 24,3 (в воде) [1]
Стандарт	1 г = 70—75 цыпл. един. 1 ц. е. = 14 γ пантотеновой кислоты	1,087 г пантотената кальция = 1 г пантотеновой кислоты
Абсорбционный максимум	500 мμ	—

[1] Оптическая активность.

ным образом хорошо кристаллизующаяся кальциевая соль пантотеновой кислоты.

В основу метода определения пантотеновой кислоты и пантотената кальция положена реакция, описанная Шальковским и Девидсоном (Szalkowsky, Davidson, 1958), Воллиш и Шмолом (Wollish, Schmall, 1950). Принцип метода заключается в том, что пантотеновая кислота (I) подвергается гидролизу с образованием β-аланина и γ-бутиролактона (II). Лактон подвергают обработке гидроксиламином в щелочной среде; при дальнейшей реакции гидроксамовой кислоты (III) с раствором $FeCl_3$ получают окрашенный продукт — гидроксамат железа (IV), определяемый по стандартному графику при $\lambda = 515\ m\mu$.

Реакция протекает в следующем направлении:

$$(HOCH_2-\underset{\underset{(CH_3)_2}{|}}{C}-CHOH-CONHCH_2CH_2COO)_2Ca \xrightarrow{HCl}$$

I

$$\rightarrow (CH_3)_2-C-CHOH \xrightarrow[NaOH]{NH_2OH} HOCH_2-\overset{(CH_3)_2}{C}-CHOH-CONHOH$$

$$H_2C \quad CO$$

$$O$$

II III

$$\xrightarrow[\text{(кислота)}]{FeCl_3} Fe[HOCH_2-\underset{\underset{(CH_3)_2}{|}}{C}-CHOH-CONHO]_3 + 3H_2O$$

IV

Этот метод был проверен в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ В. В. Никифоровой и показал возможность его применения для контроля качества пантотеновой кислоты.

Кроме того, качество пантотената кальция может быть определено комплексонометрическим титрованием, в настоящее время все более широко применяющимся в аналитических лабораториях. Этот метод подробно описан В. И. Кузнецовым и В. А. Михайловым (1957). Он основан на том, что динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты легко образует комплексы с рядом металлов, в том числе с кальцием. Конец реакции

комплексообразования определяется применением внутреннего индикатора, эриохрома черного.

$$\begin{matrix} HOOCCH_2 \\ HOOCCH_2 \end{matrix} \rangle N-CH_2-CH_2-N \langle \begin{matrix} CH_2COONa \\ CH_2COONa \end{matrix} \cdot 2H_2O$$

Динатриевая соль этилендиамин-тетрауксусной кислоты, комплексон III или трилон Б. М. вес. 372,3.

Брутто-формула: $C_{10}H_{12}O_8N_2H_2Na_2 \cdot 2H_2O$.

Этот способ, как показали исследования В. В. Никифоровой в нашей лаборатории, также может быть применен для дополнительной оценки качества пантотената кальция.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

Определение по лактону. Точную навеску вещества в количестве 0,1—0,15 г растворяют в воде в мерной колбе емкостью 50 мл и доводят до метки водой. Из полученного раствора отбирают 1 мл в мерную колбу емкостью 50 мл, добавляют 4 мл воды, 3 мл 1 н. раствора HCl, горло колбы закрывают ватной пробкой и оставляют на 3 часа в термостате при 80°.

По окончании гидролиза колбу с содержимым охлаждают, добавляют 2 мл щелочного раствора гидроксиламина, 5 мл 1 н. раствора NaOH, перемешивают и оставляют на 5 минут.

После выдержки в течение указанного времени смесь в мерной колбе оттитровывают 1 н раствором HCl до обесцвечивания в присутствии 2—3 капель 2,4-динитрофенола в качестве индикатора. Содержимое колбы доводят до метки водой и перемешивают. Из полученного раствора отбирают 10 мл и добавляют 2 мл 2% водного раствора $FeCl_3$.

Развивается красноватая окраска, интенсивность которой измеряют с помощью фотоэлектроколориметра, пользуясь зеленым светофильтром, и сравнивают показания с показаниями для стандартного раствора пантотената кальция, обработанного точно таким же образом.

Контрольный опыт для пантотената кальция приготовляется тем же способом, но без проведения гидролиза.

Содержание пантотената кальция в препарате в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{n \cdot b \cdot 100}{n_1 \cdot a},$$

где n — показание прибора для исследуемой пробы за вычетом показания для контрольного опыта;

n_1 — показания прибора для стандарта за вычетом контроля для стандарта;

a — навеска исследуемой пробы в г;

b — навеска стандартного препарата в г;

100 — пересчет в %.

Комплексонометрическое титрование. Точную навеску вещества в количестве 0,3—0,7 г растворяют в небольшом количестве воды, к раствору добавляют 25 мл 0,1 М раствора комплексона III и 10 мл аммиачного раствора и титруют 0,1 М раствором $ZnSO_4$ в присутствии эриохрома черного (в качестве индикатора).

Расчет содержания пантотената кальция в препарате в процентах (x) производят по формуле:

$$x = \frac{(v_1 - v_2) \cdot 0,047653\ 100}{a},$$

где v_1 — количество точного 0,1 М раствора $ZnSO_4$, пошедшее на контрольное титрование, в мл;

v_2 — количество точного 0,1 М раствора $ZnSO_4$, пошедшее на титрование навески испытуемого образца, в мл;

a — навеска в г;

0,047653 — количество пантотената кальция, соответствующее 1 мл точного 0,1 М раствора комплексона III, в г;

100 — пересчет в %.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ ПАНТОТЕНАТА КАЛЬЦИЯ ПО АМИННОМУ АЗОТУ С РЕАКТИВОМ НЕССЛЕРА

Навеску вещества в количестве 0,05—0,06 г (точная навеска) растворяют в воде, переносят в мерную колбу емкостью 25 мл и доводят водой до метки (раствор А).

5 мл раствора А переносят в колбу Къельдаля емкостью 100 мл, добавляют 1 мл концентрированной H_2SO_4 (уд. в. 1,84), помещают на электроплитку и нагревают до потемнения раствора. Содержимое колбы охлаждают, прибавляют 2—3 капли пергидроля и снова нагревают до обесцвечивания раствора (в течение 10 минут).

После сожжения содержимое колбы количественно переносят в мерную колбу емкостью 25 мл. Промывают водой, сливая в ту же колбу промывные воды, и доводят водой до метки (раствор Б).

На реакцию отбирают 1 мл раствора Б в мерную колбу емкостью 25 мл, прибавляют 10—15 мл воды, 2 мл реактива Несслера, доводят водой до метки и перемешивают.

После пятиминутной выдержки измеряют развившуюся желтую окраску раствора на электрофотоколориметре со светофильтром 440 mμ.

Параллельно ставят контрольный опыт на реактивы.

Содержание пантотената кальция в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{c \cdot v_1 \cdot v_3 \cdot 17,02 \cdot 100}{a \cdot v_2 \cdot v_4 \cdot 1000 \cdot 1000},$$

где c — количество аминного азота в пробе, найденное по калибровочному графику, в γ;

a — навеска в г;

v_1 — объем первого разведения в мл;

v_2 — количество первого разведения, взятое на сожжение, в мл;

v_3 — объем второго разведения в мл;

v_4 — объем второго разведеиия, взятый на реакцию, в мл;

100 — пересчет в %;

17,02 — фактор пересчета пантотената кальция по азоту;

1000 — пересчет в мг;

1000 — пересчет в г.

Построение калибровочного графика 0,059 г (точная навеска) предварительно высушенного при 105° х. ч $(NH_4)_2SO_4$ растворяют в воде в мерной колбе на 250 мл и доводят водой до метки. Содержание аминного азота в растворе 0,05 мг/мл.

В мерные колбы емкостью 25 мл отбирают соответственно 3, 5, 7, 10, 15, 20 мл основного раствора, добавляют по 3 мл 10% раствора H_2SO_4, доводят водой до метки и перемешивают.

На реакцию с реактивом Несслера отбирают из каждого раствора по 1 мл в мерные колбы емкостью 25 мл, добавляют по 2 мл реактива Несслера и доводят водой до метки. После перемешивания и 5-минутной выдержки измеряют оптическую плотность растворов на электрофотоколориметре со светофильтром 440 mμ.

Для установки прибора на нуль пользуются водой. Параллельно ставят контроль на реактивы, вычитая в дальнейшем экстинкцию контроля из экстинкции испытуемых растворов.

Величины экстинкций, найденных по показаниям прибора, откладывают по оси ординат, а по оси абсцисс — соответствующие им концентрации азота в гаммах.

Методы контроля в синтезе витамина РР (никотиновой кислоты)

ПИРИДИНОВЫЕ ОСНОВАНИЯ (СМЕСЬ β-ПИКОЛИНА И 2,6-ЛУТИДИНА)

Жидкость характерного запаха, содержит до 65% пиридиновых оснований и 35% воды. Выделение β-пиколина из смеси основано на его способности давать с сульфатом меди нерастворимую комплексную соль, которая отделяется таким образом от 2,6-лутидина, находящегося в свободном состоянии. Способ разделения разработан в синтетической лаборатории ВНИВИ Е. С. Жданович и А. Ф. Галкиным.

$$2\,(\beta\text{-пиколин: } N,\ CH_3) + (2,6\text{-лутидин: } H_3C,\ N,\ CH_3) \xrightarrow{CuSO_4} (\beta\text{-пиколин})_2 \cdot CuSO_4 + 2,6\text{-лутидин}$$

Под действием щелочи происходит разложение комплексной соли β-пиколина, свободное основание выделяется в виде маслянистого слоя.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛАГИ В СМЕСИ ПИРИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ

(метод разработан Е. С. Жданович и А. Ф. Галкиным, ВНИВИ)

В мерный цилиндр с притертой пробкой емкостью 50 мл вносят 5 мл испытуемой смеси β-пиколина и 2,6-лутидина и 45 мл сухого бензина, встряхивают и оставляют до полного расслоения.

Расчет содержания влаги в процентах (x) производят по формуле:

$$x = \frac{v_1 \cdot 100}{v},$$

где v_1 — объем влаги в мл;
v — объем испытуемой смеси

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФОРМАЛЬДЕГИДА

(по прописи Ю. И. Чумакова, лаборатория завода «Акрихин»)

Точную навеску смеси пиридиновых оснований в количестве 10—15 г помещают в мерную колбу емкостью 250 мл и доводят водой до метки. Из полученного раствора отбирают 10 мл в коническую колбу с притертой пробкой; туда же добавляют 25 мл точного 0,1 н. раствора йода и 10 мл 4% раствора NaOH. Колбу закрывают пробкой, взбалтывают и оставляют в темном месте иа 10 минут. По истечении указанного времени в колбу прибавляют 10 мл 10% раствора H_2SO_4 и выделившийся йод тотчас оттитровывают 0,1 н. раствором $Na_2S_2O_3$ до исчезновения окрашивания. Параллельно проводят контрольный опыт с реактивами.

Расчет процентного содержания формальдегида в смеси (x) производят по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0{,}0015 \cdot 250 \cdot 100}{10\ a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшее на титрование контрольного опыта, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшее на титрование испытуемой пробы, в мл;
0,0015 — количество формальдегида, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, в г;
10 — объем раствора, взятый на анализ, в мл;
250 — объем разведения навески в мл;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦА ОТМЫВКИ КОМПЛЕКСНОЙ СОЛИ

(по прописи Ю. И. Чумакова, лаборатория завода «Акрихин») [1]

Приготовление бумаги для хроматографии и техника хроматографирования

Полоски хроматографической фильтровальной бумаги размером 15 × 20 см погружают в смесь, состоящую из 5 г хлорной меди, 20 мл глицерина и 100 мл воды. Затем их слегка отжимают между лентами фильтровальной бумаги и высушивают на воздухе.

Хроматографирование осуществляют в цилиндре, на дно которого налит в качестве растворителя серный эфир. Цилиндр закрывают пробкой, через которую пропущен стеклянный или металлический крючок для подвешивания полосок бумаги, обработанных водно-глицериновым раствором хлорной меди. На расстоянии 1—1,5 см от нижнего края полоски бумаги помещают каплю исследуемого раствора и полоску опускают нижним концом в эфир. Проявление заканчивается через 10—20 минут. Хроматограммы смесей β-пиколина и 2,6-лутидина представлены на рис. 23. К 20 г комплексной соли прибавляют 20—40 мл 20—30% раствора NaOH, переме-

[1] В основу предложениого Ю И. Чумаковым метода положен способ хроматографического разделения двойных и тройных смесей пиридиновых оснований, описанный Вигье и Шерве (Viguet, Chervet, 1951)

шивают, верхний слой сливают в пробирку. После того как β-пиколин отстоялся, его отбирают узким капилляром и каплю его наносят на полоску хроматографической бумаги, обработанной, как указано выше. Полоску бумаги подвешивают в цилиндр, нижний конец ее опускают в эфир. Через 10—15 минут проявление заканчивается. Проявляется полоса β-пиколина чистого голубого цвета. Примеси 2,6-лутидина (сиреневого цвета) должно быть не больше, чем в эталонной смеси.

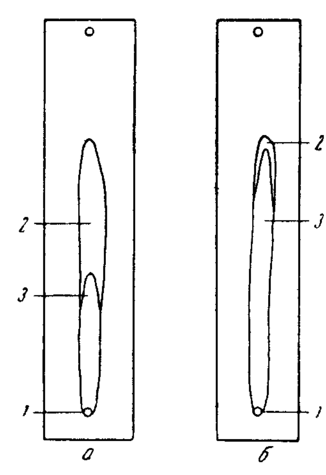


Рис. 23. Хроматограммы смеси β-пиколина +2,6-лутидина.

а — хроматограмма смеси 50% β-пиколина +50% 2,6-лутидина; *б* — хроматограмма эталона 95% β-пиколина +5% 2,6-лутидина; *1* — место нанесения испытуемого раствора; *2* — лиловая полоса 2,6-лутидина; *3* — зеленовато-голубая полоса β-пиколина.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВА β-ПИКОЛИНА

(по прописи Ю. И. Чумакова, лаборатория завода «Акрихин»)

К 5—10 мл водного раствора β-пиколина прибавляют 2,3 г твердого NaOH, встряхивают и дают отстояться в течение 5—10 минут. После разделения слоев тонким капилляром отбирают каплю β-пиколина и хроматографируют, как описано выше. Примеси 2,6-лутидина должно быть не больше, чем в эталоне.

ВИТАМИН PP (β-ПИРИДИНКАРБОНОВАЯ КИСЛОТА)

Витамин PP — никотиновая кислота — имеет следующее строение:

COOH, N — Никотиновая кислота

$CONH_2$, N — Никотинамид

В виде никотинамида никотиновая кислота входит в качестве активной группы в состав молекулы ряда

ферментов. В естественных продуктах, кроме связанной формы никотиновой кислоты, встречается также свободная никотиновая кислота и ее амид.

Промышленными препаратами витамина PP являются синтетическая никотиновая кислота и ее амид в кристаллическом виде, а также в драже, таблетках и растворах для инъекций.

Физико-химические свойства никотиновой кислоты

Показатель	Характеристика	
	никотиновая кислота	никотинамид
Состояние вещества	Бесцветные кристаллы	
Вкус	Слабокислый	Горьковатый
Запах	Практически отсутствует	Очень слабый
Формула	$C_6H_5O_2N$	$C_6H_6ON_2$
Молекулярный вес	123,11	122,13
Температура плавления	234—238°	128—131°
Растворимость	В воде при 25°—1,67/100 мл, в этаноле—0,73/100 мл, в эфире не растворяется	В воде при 25°—100/100 мл, в этаноле—66/100 мл, в эфире очень плохо растворим
pH 1% раствора	3,0	6,0
Максимум абсорбции	385 и 375 mμ для CNBr комплекса	212 mμ
Флуоресценция (для N — метилникотинамида)	—	Голубая

Никотиновой кислоте свойственна достаточно специфическая реакция образования глутаконового альдегида:

COOH, N + BrCN → COOH, N, NC, Br —2R→ HC, CH, R—CH, R+ · Br—

При взаимодействии никотиновой кислоты с бромистым цианом образуется цианбромидное производное никотиновой кислоты, которое в присутствии ароматических аминов (R) дает интенсивно окрашенный продукт, производное глутаконового альдегида, дианилид. Найде-

но, что KCN в этой реакции может быть с успехом заменен KCNS, что имеет практическое значение: реакция никотиновой кислоты с KCNS или NH_4CNS, заменяющими ядовитый KCN, оказывается более стабильной, позволяет производить повторные измерения окраски без ограничения времени и является более чувствительной, чем реакция с KCN. Свойством никотиновой кислоты давать описанную реакцию широко пользуются в аналитической практике.

Никотиновой кислоте, как β-пиридинкарбоновой кислоте, свойственно также образование нерастворимых комплексов с окисными солями меди. Учитывая количество меди, введенной в анализ (йодометрическим путем) и оставшейся в свободном состоянии, можно рассчитать количество ее, пошедшее на образование медного комплекса. Реакция протекает в стехиометрических отношениях и используется поэтому для количественного анализа.

В чистых растворах никотиновая кислота может быть оттитрована щелочью, однако при этом нужно учитывать возможность присутствия в растворе изоникотиновой кислоты. Вследствие этого алкалиметрический метод не может иметь столь широкого применения.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ ДЛЯ ОТЛИЧИЯ НИКОТИНАМИДА ОТ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Небольшое количество испытуемого кристаллического препарата или мелко измельченного в ступке драже или таблеток с витамином PP помещают в пробирку, добавляют 1—2 мл воды, $^1/_2$ объема 40% водного раствора NaOH и содержимое пробирки нагревают около 5 минут на кипящей водяной бане. В присутствии никотинамида развивается запах аммиака и красная лакмусовая бумажка, смоченная водой, синеет, что позволяет отличать никотинамид от никотиновой кислоты.

ОБЪЕМНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ПРЕПАРАТЕ, В ДРАЖЕ И ТАБЛЕТКАХ[1]

При анализе драже и таблеток взвешивают 30—50 шт. и определяют вес 1 шт. как среднее арифметическое. Отобранную пробу тщательно растирают в ступке.

[1] По IX Госфармакопее СССР.

Точную навеску в количестве около 0,5 г кристаллической никотиновой кислоты или соответствующую навеску растертого драже или таблеток, содержащую около 0,5 г витамина PP, растворяют в 25 мл горячей воды; по охлаждении нейтрализуют по фенолфталеину 0,5 н., а под конец — 0,1 н. раствором NaOH, переводят в мерную колбу емкостью 100 мл, прибавляют точно 20 мл 5% раствора сернокислой меди, доводят до метки водой, перемешивают и через 10—15 минут фильтруют в сухую колбу, отбрасывая первые 25 мл фильтрата. 50 мл фильтрата переносят в колбу с притертой пробкой, прибавляют 10 мл разведенной (1 : 2) соляной кислоты, 2 г йодистого калия, колбу закрывают пробкой и оставляют на 10 минут в темноте. Выделившийся йод титруют 0,1 н. раствором $Na_2S_2O_3$ (индикатор крахмал).

Параллельно в тех же точно условиях проводят контрольный опыт. Разность между титрованием контрольного и испытуемого раствора пересчитывают на никотиновую кислоту.

Содержание никотиновой кислоты в кристаллическом продукте в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1)\cdot 0,02462\cdot 100\cdot 100}{a\cdot 50},$$

где v — объем точного 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшего на титрование контрольной пробы, в мл;

v_1 — объем точного 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшего на титрование испытуемой пробы, в мл;

0,02462 — количество никотиновой кислоты, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, в г;

a — навеска в г;

100 — объем, до которого доведена навеска, в мл;

50 — количество раствора, взятое на титрование, в мл;

100 — пересчет в %.

Содержание никотиновой кислоты в миллиграммах в 1 шт. драже или таблеток вычисляют по формуле:

$$x_1 = \frac{(v - v_1)\cdot 24,62\cdot d\cdot 100}{a\cdot 50},$$

где d — средний вес 1 шт. драже или таблеток в г;
100 — объем, до которого доведена навеска, в мл;
50 — количество раствора, взятого на титрование, в мл;
24,62 — количество никотиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, в мг;
Остальные обозначения см. выше.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИКОТИНАМИДА В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ПРЕПАРАТЕ, ДРАЖЕ И ТАБЛЕТКАХ[1]

Точную навеску кристаллического препарата в количестве около 0,2 г или соответствующую навеску мелко измельченных драже или таблеток, содержащую около 0,2 г никотинамида, взятую на аналитических весах, переносят в круглодонную колбу емкостью 100—120 мл, прибавляют 75 мл воды, колбу закрывают резиновой пробкой с двумя отверстиями, в которые вставлены каплеуловитель и капельная воронка. Каплеуловитель соединяют с холодильником Либиха, на форштосс которого надета трубка, погруженная в точно отмеренное в приемную колбу количество (35 мл) 0,1 н. раствора H_2SO_4 с 1—2 каплями метилового оранжевого.

Через капельную воронку в отгоночную колбу наливают 25 мл 40% раствора NaOH, быстро закрывают кран воронки и отгоняют с водяным паром. Отгонку жидкости в колбе ведут до тех пор, пока в приемной колбе наберется около 300 мл жидкости.

Избыток внесенной в приемник серной кислоты оттитровывают 0,1 н. раствором NaOH до появления соломенно-желтого окрашивания. Параллельно в тех же условиях проводят контрольный опыт, результаты которого вычитают из результатов основного определения.

Содержание никотинамида в кристаллическом препарате в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1)\cdot 0{,}01221\cdot 100}{a},$$

где v — объем точного 0,1 н. раствора H_2SO_4, взятого в приемник, в мл;
v_1 — объем точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование, в мл;
0,01221 — количество никотинамида, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4, в г;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %[1].

[1] По IX Госфармакопее СССР.

[1] При расчете содержания никотинамида в драже и таблетках пересчет в процентах заменяется иа средний вес 1 шт. драже или таблеток в г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

(метод разработан В. М. Иосиковой в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ)

Навеску испытуемого материала в количестве 1—20 г с содержанием никотиновой кислоты в пределах 100—150 γ подвергают гидролизу при помощи 100 мл нормального раствора HCl на кипящей водяной бане в течение 1 часа.

После охлаждения вытяжку нейтрализуют 20% едким натром до pH = 6,5 (по универсальному индикатору), обрабатывают 100 мл 96% этилового спирта (при использовании отработанного спирта берут 150 мл), отфильтровывают на фарфоровой воронке от образовавшегося осадка и прозрачный фильтрат обрабатывают 2 г асканита[2], встряхивая его в течение 3 минут.

Асканит отфильтровывают на маленькой бюхнеровской воронке; фильтр с асканитом переносят в колбу, в которой обрабатывали асканитом, и извлекают из него никотиновую кислоту встряхиванием с 25 мл нормального раствора NaOH в течение 3 минут, после чего переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют. Объем центрифугата измеряют (цилиндром, которым отмеряли щелочь), переносят без потерь в стакан и обрабатывают водным насыщенным раствором сернокислого цинка. Так как при этом получается настолько густая масса, что полноту осаждения установить трудно, то обработку сернокислым цинком проводят до pH = 6,5

[2] Стандартный асканит, пригодный для определения витамина PP (№ 1), можно приобрести в Грузинском институте минерального сырья (Тбилиси, Лермонтовская ул., 10).

(по универсальному индикатору), затем фильтруют, фильтрат сливают в колбу и окисляют посторонние примеси нормальным раствором $KMnO_4$, добавляя его по каплям до получения прозрачного раствора.

Обработку перманганатом проводят с нагреванием на электроплитке (на окисление обычно требуется 4—6 капель).

После обработки перманганатом содержимое колбы охлаждают и центрифугируют, центрифугат сливают в стакан и обрабатывают кристаллическим трифосфатом калия (по фенолфталеину), затем нейтрализуют HCl (разбавленной 1 : 1) до pH = 6,5 и фильтруют на бюхнеровской воронке.

Для проведения реакции к 5 мл испытуемой вытяжки и соответственно к 5 мл стандарта, содержащего 10 γ никотиновой кислоты, предварительно прогретых на кипящей водяной бане в течение 5 минут, приливают по 2 мл раствора бромистого родана и 7 мл спиртового раствора анилина.

По прошествии ½—1 часа фильтруют через бумажный фильтр и колориметрируют в колориметре Дюбоска или электрофотоколориметре со светофильтром 440 mμ, применяя в последнем случае контроль в виде разбавленного водой спирта (1 : 1).

Расчет содержания никотиновой кислоты в миллиграмм-процентах в испытуемом объекте (x) производят по формуле:

а) для колориметра Дюбоска:

$$x = \frac{25 \cdot v_1 \cdot h \cdot 10 \cdot 100}{a \cdot v \cdot 5 \cdot h_1 \cdot 1000},$$

где 25 — количество щелочи, взятое для элюции, в мл;
a — навеска в г;
v_1 — объем элюата после обработки сернокислым цинком, в мл;
v — объем элюата в мл;
h — высота столба стандартного раствора в мм;
5 — количество вытяжки, взятое для реакции, в мл;
10 — содержание никотиновой кислоты в стандартном растворе в γ;
h_1 — высота столба испытуемого раствора в мм;
100 — пересчет в %;
1000 — пересчет в мг.

б) для электрофотоколориметра:

$$x = \frac{25 \cdot v_1 \cdot n_1 \cdot 10 \cdot 100}{a \cdot v \cdot 5 \cdot n \cdot 1000},$$

где n — показание прибора для стандартного раствора;
n_1 — показание прибора для испытуемого раствора.

Остальные обозначения см. выше.

Удобнее пользоваться калибровочным графиком. Для этого 100 мг никотиновой кислоты растворяют в мерной колбе емкостью 100 мл в 20 мл спирта и по растворении доводят водой до объема. 5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят водой до объема. В 1 мл раствора содержится 50 γ никотиновой кислоты. К 4 мл полученного раствора (200 γ никотиновой кислоты) прибавляют 25 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4, 2 г асканита, встряхивают 3 минуты и отфильтровывают.

Фильтр с асканитом переносят в колбу, в которой обрабатывали асканитом, извлекают никотиновую кислоту встряхиванием с 25 мл нормального раствора NaOH, центрифугируют и измеряют объем центрифугата цилиндром, которым отмеряли щелочь. Центрифугат сливают в стакан, обрабатывают раствором $ZnSO_4$ до pH=6,5 и фильтруют. Фильтрат сливают в коническую колбу, добавляют 1 каплю нормального раствора перманганата калия, доводят до кипения, охлаждают и центрифугируют. Центрифугат сливают в стакан, добавляют несколько капель фенолфталеина и обрабатывают кристаллическим трифосфатом калия до ясно-розового окрашивания, добавляют разведенную HCl и фильтруют.

В конические колбы емкостью 20 мл помещают 2, 3, 4 и 5 мл фильтрата, объем в каждой колбе доводят до 5 мл водой, закрывают колбы пробками, помещают на 5 минут в кипящую водяную баню и проводят реакцию так же, как и для испытуемого объекта. Через 30—60 минут фильтруют и измеряют окраску на фотоколориметре.

Для построения калибровочного графика по оси ординат откладывают показания прибора, а по оси абсцисс — соответствующие им концентрации никотиновой кислоты в гаммах.

РОДАНБРОМИДНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИКОТИНАМИДА И НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПОЛИВИТАМИННОМ ДРАЖЕ И ТАБЛЕТКАХ

(метод разработан В. М. Иосиковой в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ)

Точную навеску растертых драже или таблеток в количестве 0,5 г растворяют в воде в мерной колбе емкостью 100 мл, доводят объем до метки водой, хорошо перемешивают и фильтруют.

1 мл фильтрата переносят в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят объем до метки водой.

Для проведения реакции используют 5 конических колб с пробками емкостью 15—20 мл.

В три колбы наливают по 5 мл испытуемого раствора, в четвертую колбу — 5 мл стандартного раствора и в пятую — 5 мл дистиллированной воды. Колбы закрывают пробками, помещают в штатив, который опускают в кипящую водяную баню на 5 минут. Во время прогревания готовят роданбромидный раствор. После прогревания штатив с колбами вынимают из бани, открывают пробки, в градуированную пипетку на 10 мл при помощи груши набирают роданбромидный раствор и в каждую колбу спускают по 2 мл этого раствора. Затем в каждую колбу добавляют по 7 мл спиртового раствора анилина, содержимое колб перемешивают, закрывают пробками и оставляют для образования окраски на 30—60 минут. После этого фильтруют и интенсивность окраски фильтратов измеряют на электрофотоколориметре.

Расчет содержания витамина PP в миллиграммах в 1 шт. драже или таблеток (x) производят по формуле:

$$x = \frac{100 \cdot 100\ n_1 \cdot c \cdot d}{a \cdot 1 \cdot 5 \cdot n \cdot 1000},$$

где a — навеска в г;
100 и 100 — разведение;

5 — количество раствора, взятое для реакции, в мл;
n — показание прибора для стандартного раствора;
n_1 — показание прибора для испытуемого раствора[1];
c — содержание никотиновой кислоты в 5 мл стандартного раствора в γ;
d — средний вес драже или таблеток в г;
1000 — пересчет в мг.

При пользовании калибровочным графиком формула расчета следующая:

$$x = \frac{100 \cdot 100 \cdot c \cdot d}{a \cdot 1 \cdot 5 \cdot 1000},$$

где c — количество никотиновой кислоты в испытуемом растворе, найденное по калибровочному графику, в γ.

Остальные обозначения см. выше.

В случае наличия в поливитаминных препаратах рибофлавина проводят обработку асканитом, как указано выше, или поступают следующим образом (по прописи Л. Н. Кравчиной и В. И. Колтуновой):

1 г растертой массы поливитаминных драже или таблеток (точная навеска) растворяют в стакане в воде, переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, доводят до метки водой, перемешивают и фильтруют. Из фильтрата отбирают 2 мл, переносят в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят водой до метки. Этот раствор поступает на определение рибофлавина непосредственно измерением флуоресценции, как описано в разделе «Определение рибофлавина».

Затем приступают к определению содержания никотинамида или никотиновой кислоты в фильтрате. Для этого подготавливают 6 конических колб емкостью 15—20 мл. В первую из них вносят 5 мл стандартного раствора никотинамида или никотиновой кислоты, содержащего 0,2 мг в 1 мл, во вторую — 5 мл фильтрата, в котором должно содержаться около 0,6 мг никотинамида или никотиновой кислоты и около 0,1 мг рибофлавина,

---

[1] Среднее из определения в трех первых колбах.

третья колба служит для контрольного опыта на то количество рибофлавина, которое взято в анализ во второй колбе. Для этого отбирают рассчитанное количество раствора рибофлавина из основного стандартного раствора, содержащего 40 γ рибофлавина в 1 мл.

Остальные три колбы служат для параллельных опытов. Содержимое всех колб подогревают на водяной бане и далее поступают, как описано выше.

Содержание никотинамида или никотиновой кислоты в миллиграммах в 1 шт. драже или таблеток (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(n_1 - n_2) \cdot c \cdot v_1 \cdot d}{a \cdot n \cdot v_2},$$

где n_1 — показания прибора для испытуемого раствора;

n_2 — показания прибора для контроля на рибофлавин;

c — содержание никотинамида или никотиновой кислоты в стандартном растворе в мг;

v_1 — объем, до которого доведена навеска, в мл;

d — средний вес 1 шт. драже или таблеток в г;

a — навеска в г;

n — показания прибора для стандартного раствора;

v_2 — количество вытяжки, взятое на реакцию, в мл.

Примечание Указанные величины навески и разведения рассчитаны для драже и таблеток, содержащих в 1 шт весом 1 г 0,5 мг рибофлавина и 3 мг никотинамида При анализе препаратов с другим содержанием рибофлавина и никотинамида необходимо соответственно изменить объем разведения, сохранив количества рибофлавина и никотинамида, идущие на реакцию (около 600 γ никотинамида и около 100 γ рибофлавина) Если на реакцию приходится брать не 5 мл фильтрата, а меньше, то добавляют соответственное количество воды, чтобы сохранить общий объем 5 мл.

Определение никотинамида неводным титрованием. В химико-аналитической лаборатории ВНИВИ В. А. Девятниным и М. Я. Мойжес разработан метод определения никотинамида в водных ампулированных растворах, позволяющий обойтись без длительной процедуры отгонки аммиака, что представляет известные удобства для производственного контроля препаратов никотинамида,

Химизм реакции титрования никотинамида в уксусной кислоте хлорной кислотой можно представить следующим образом:

$$CONH_2 \quad + CH_3COOH \rightleftarrows \quad CONH_3 \quad + CH_3COO-$$

$$HClO_4 + CH_3COOH \rightleftarrows CH_3COOH_2^+ + ClO_4^-$$

$$CH_3COOH_2 + CH_3COO^- \rightleftarrows 2CH_3COOH$$

$$CONH_2 \quad + HClO_4 \rightleftarrows \left[\quad CONH_3 \quad \right] + ClO_4-$$

Присутствующая в препарате вода связывается уксусным ангидридом. На этом принципе построен анализ кристаллического никотинамида, но без применения уксусного ангидрида.

К 2 мл 1%, или к 1 мл 2,5%, или к 0,5 мл 5% или 10% растворов никотинамида, взятых пипеткой в коническую колбу емкостью 50 мл, снабженную пробкой с воздушным холодильником, приливают 10 мл уксусного ангидрида, колбу закрывают пробкой и нагревают на кипящей водяной бане 30 минут. Пробку вынимают, осторожно удаляют фильтровальной бумагой капли воды с горлышка колбы, содержимое ее охлаждают до комнатной температуры, в колбу приливают 10 мл безводной уксусной кислоты, 5 капель индикатора кристаллического фиолетового, приготовленного на безводной уксусной кислоте и титруют 0,1 н. раствором хлорной кислоты до изумрудно-зеленой окраски раствора. Одновременно ставят контрольный опыт на реактивы.

Содержание никотинамида в 1 мл раствора в граммах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0{,}01221}{a},$$

где v — количество 0,1 н. раствора хлорной кислоты, пошедшее на титрование препарата, в мл,

v_1 — количество 0,1 н. раствора хлорной кислоты, пошедшее на титрование контрольной пробы, в мл.

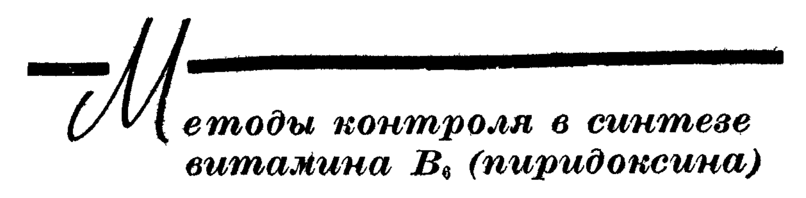
0,01221 — см. выше.

a — количество раствора, взятое на определение, в мл.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В РАСТВОРАХ НИКОТИНАТА НАТРИЯ

(по IX Госфармакопее СССР)

10 мл препарата помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, приливают 2 капли фенолфталеина и 0,1 н. раствора едкого натра до появления бледно-розового окрашивания, добавляют 5 мл 5% раствора сульфата меди и далее проводят определение, как описано в объемном методе определения никотиновой кислоты (см. стр. 160).



МЕТИЛОВЫЙ ЭФИР МЕТОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

$CH_3OCH_2COOCH_3$ М. вес 104,1

Бесцветная жидкость, смешивающаяся во всех отношениях с водой, хлороформом и этиловым спиртом. Т. кип. 129,6—130,2° при 760 мм, $n_D^{20'} = 1,396$.

Методика анализа эфира разработана Л. А. Петровой.

Метод основан на гидролитическом расщеплении сложного эфира щелочью:

$$CH_3OCH_2COOCH_3 + NaOH \rightarrow CH_3OCH_2COONa + CH_3OH.$$

Так как эфир может быть загрязнен хлороформом в связи с условиями его получения, причем хлороформ, вступая в реакцию со щелочью:

$$CHCl_3 + 4NaOH \rightarrow 3NaCl + HCOONa,$$

может завышать результаты определения, то для компенсации влияния примеси хлороформа проводят дополнительное определение хлориона по Фольгарду.

В коническую колбу с притертой пробкой емкостью 100 мл помещают точную навеску эфира в количестве 0,09—0,12 г. В колбу с навеской добавляют из бюретки 20 мл 0,1 н. раствора NaOH и кипятят с обратным холодильником в течение 5—10 минут. Охлажденный раствор

титруют 0,1 н. раствором H_2SO_4 в присутствии нескольких капель фенолфталеина.

К оттитрованному раствору добавляют 1 мл концентрированной HNO_3 (уд. вес 1,4) и из бюретки 2 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$. Появление мути или осадка указывает на присутствие в пробе хлорида. В этом случае в колбу добавляют 10 мл бензола, закрывают ее пробкой и энергично встряхивают. После некоторого отстаивания на границе жидкостей собирается хлорид серебра, нижний слой становится прозрачным. Добавляют 1 мл железоаммониевых квасцов и титруют 0,1 н. раствором KCNS или NH_4CNS до появления неисчезающего красноватого окрашивания.

Расчет процентного содержания эфира в пробе (x) производят по формуле:

$$x = \frac{0,0104 \cdot 1000}{a} \cdot (v - v_1) - 1,333(v_2 - v_3),$$

где 0,0104 — количество метилового эфира метоксиуксусной кислоты, соответствущее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;
a — навеска вещества в г;
100 — пересчет в %;
v — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, взятое для гидролиза, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора H_2SO_4, пошедшее на титрование избытка щелочи, в мл;
1,333 — количество эфира, эквивалентное 1 атому хлора, в молях;
v_2 — количество точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, взятое в анализ, в мл;
v_3 — количество точного 0,1 н. раствора роданата, пошедшее на титрование, в мл.

2-МЕТИЛ-4-МЕТОКСИМЕТИЛ-5-ЦИАН-6-ОКСИПИРИДИН

CH_2OCH_3, CN, H_3C, N, OH

$C_9H_{10}N_2O_2$
М. вес 178,19

Бесцветный кристаллический продукт, трудно растворимый в воде и органических растворителях. Т. пл. 241—242°.

Метод анализа разработан Л. А. Петровой.

Метод основан на том, что фенольный гидроксил в 6-м положении легко образует соли. Титрованием с метиловым красным производят нейтрализацию вещества, а применение индикатора тимолфталеина дает возможность определить конец образования соли. По количеству вступившего в эту реакцию NaOH определяют содержание 2-метил-4-метоксиметил-5-циан-6-оксипиридина.

CH_2OCH_3, CN, H_3C, N, OH + NaOH → CH_2OCH_3, CN, H_3C, N, ONa + H_2O

Для этого в коническую колбу помещают навеску вещества в количестве 0,15 г и растворяют при кратковременном нагревании на кипящей водяной бане в 20 мл 96% этилового спирта. Не давая раствору охладиться, его титруют 0,1 н. раствором NaOH в присутствии 0,5 мл метилового красного до исчезновения розовой окраски. К раствору добавляют 0,5 мл тимолфталеина и продолжают титровать до первого изменения окраски (зеленое окрашивание).

Содержание 2-метил-4-метоксиметил-5-циан-6-оксипиридина в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0,0178 \cdot 100}{a},$$

где v — общее количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование с двумя индикаторами, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование с метиловым красным, в мл;
0,0178 — количество оксипиридина, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

2-МЕТИЛ-3-НИТРО-4-МЕТОКСИМЕТИЛ-5-ЦИАН-6-ОКСИПИРИДИН

$C_9H_9N_3O_4$
М. вес 223,2

Бесцветный кристаллический продукт, слабо растворимый в воде, растворимый в органических растворителях.

Метод контроля качества продукта разработан Л. А. Петровой. В основу его положен способ, подробно описанный Хинкелем, Айлином и Вальтерсом (Hinkel, Ayling, Walters, 1939), восстановления нитрогруппы в органических соединениях хлористым оловом. Он заключается в нагревании вещества с титрованным раствором хлористого олова в соляной кислоте. Превращения могут быть выражены следующим уравнением:

$$RNO_2 + 3SnCl_2 + 6HCl \rightarrow RNH_2 + 3SnCl_4 + 2H_2O$$[1].

По окончании восстановления избыток хлористого олова определяется титрованием раствором йода. По количеству олова, пошедшего на восстановление нитрогруппы в аминогруппу, судят о процентном содержании нитрогруппы, а следовательно, и вещества.

Техника метода. Точную навеску вещества в количестве 0,1 г переносят с помощью 6 мл 50% этилового спирта в реакционную колбу, снабженную пробкой с обратным холодильником и трубкой для пропускания через раствор инертного газа. Колбу закрывают пробкой и помещают в горячую водяную баню. Как только навеска полностью растворится, в колбу добавляют 5 мл серной кислоты, разведенной водой в отношении 1:1, и 2 мл раствора хлористого олова. Смесь в колбе подвергают нагреванию на водяной бане в течение 30 минут, пропуская в колбу углекислоту со скоростью 1—2 пузырька в секунду. По прошествии указанного времени колбу вынимают из бани, добавляют 50 мл воды и содержимое ее титруют 0,2 н. раствором йода в присутствии крахмала в качестве индикатора.

[1] Губен — Вейль. Методы органической химии, т. II. ГНТизд. Хим. Л. М., 1963.

Содержание 2-метил-3-нитро-4-метоксиметил-5-циан-6-оксипиридина в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1)\cdot 0,0744\cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,2 н. раствора йода, пошедшее на титрование 2 мл раствора хлористого олова, в мл;
v_1 — количество точного 0,2 н. раствора йода, пошедшее на титрование пробы после восстановления, в мл;
0,0744 — количество нитрооксипиридина, соответствующее 1 мл точного 0,2 н. раствора йода, в г;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

2-МЕТИЛ-3-НИТРО-4-МЕТОКСИМЕТИЛ-5-ЦИАН-6-ХЛОРПИРИДИН

$C_9H_8O_3N_3Cl$
М. вес 241,6

Бесцветный кристаллический продукт. Т. пл. 73—75°. Хорошо растворим в горячем этиловом спирте, растворим в петролейном эфире и ледяной уксусной кислоте; практически нерастворим в холодной воде.

Метод определения чистоты 2-метил-3-нитро-4-метоксиметил-5-циан-6-хлорпиридина разработан Л. А. Петровой в синтетической лаборатории ВНИВИ. В основу метода положен способ Шенигера (Schöniger, 1955), предложенный им для быстрой минерализации вещества на платиновой проволоке в атмосфере кислорода.

Техника метода. Точную навеску вещества в количестве около 0,05 г взвешивают на беззольном фильтре, вырезанном, как указано на рис. 24, и прикрепляют к платиновой проволоке (d=0,5—0,7 мм; l=100 мм),

впаянной в пришлифованную пробку конической колбы с отогнутыми краями (рис. 25) объемом 300—400 мл так, чтобы свободный кусочек фильтра свисал (см. рис. 24). В колбу вливают 50 мл дистиллированной воды, 8 мл 2 н. раствора KOH и 10 капель концентрированной перекиси водорода. В течение нескольких секунд колбу промывают кислородом из газометра, чтобы вытеснить воздух. Затем поджигают полоску фильтровальной бу-

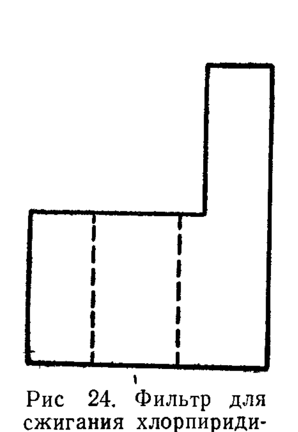


Рис 24. Фильтр для сжигания хлорпиридина.

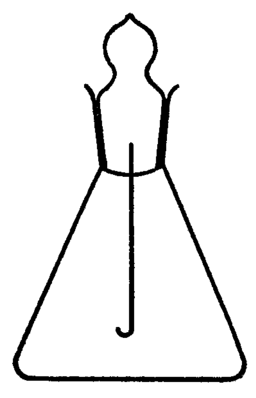


Рис. 25 Колба для сжигания и титрования хлорпиридина

маги и быстро закрывают колбу пробкой (колбу держат в левой руке, а правой придерживают пробку). По окончании сжигания в колбе образуется вакуум. Содержимое колбы энергично перемешивают в течение 10 минут. Затем в отогнутые края горла колбы наливают воду и открывают пробку. Вода омывает шлиф. Платиновую проволоку и стенки колбы также омывают водой. Щелочной раствор кипятят 3—5 минут для разрушения перекиси водорода, добавляют 5 мл 6 н. раствора HNO_3, кипятят еще 2 минуты и охлаждают содержимое до температуры ниже 25° струей водопроводной воды. К содержимому колбы добавляют 10 мл бензола или толуола, 5 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$ и энергично взбалтывают. На границе жидкостей собирается хлорид серебра, раствор же становится прозрачным. К смеси добавляют 10 мл раствора железоаммониевых квасцов и титруют 0,1 н. раствором KCNS или NH_4CNS до появления неизчезающего красно-коричневого окрашивания. За 1 каплю до конца тит-

рования появляется окрашивание, исчезающее при взбалтывании.

Содержание 2-метил-3-нитро-4-метоксиметил-5-циан-6-хлорпиридина в продукте в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) - v_2 \cdot 0{,}02416 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора нитрата серебра, взятое в реакцию, в мл;

v_1 — количество точного 0,1 н. раствора роданата, пошедшее на титрование, в мл;

0,02416 — количество 2-метил-3-нитро-4-метоксиметил-5-циан-6-хлорпиридина, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора нитрита серебра, в г;

v_2 — количество точного 0,1 н. раствора роданата, пошедшее на титрование контрольного опыта, в мл;

a — навеска в г;

100 — пересчет в %.

ХЛОРГИДРАТ 2-МЕТИЛ-3-ОКСИ-4-МЕТОКСИ-5-ОКСИМЕТИЛПИРИДИН (МЕТИЛОВЫЙ ЭФИР ПИРИДОКСИНА)

CH_2OCH_3, HO, CH_2OH, H_3C, N·HCl

$C_9H_{14}NO_3Cl$
М вес 219,6

Кристаллический бесцветный продукт. Т. пл. 176°. Хорошо растворим в воде, трудно — в этиловом спирте, плохо — в ацетоне.

Метод анализа разработан Л. А. Петровой

(структура: CH_2OCH_3, HO, CH_2OH, H_3C, N·HCl) + NaOH → (структура: CH_2OCH_3, HO, CH_2OH, H_3C, N) + NaCl + H_2O

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

Точную навеску метилового эфира пиридоксина в количестве 0,1—0,2 г растворяют в 10—15 мл воды и титруют 0,1 н. раствором NaOH в присутствии 3 капель бромтимолового синего до изменения окраски.

Расчет процентного содержания (x) производят по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0,02196 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;
0,02196 — количество эфира пиридоксина, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

ХЛОРИСТЫЙ ПАЛЛАДИЙ РЕГЕНЕРИРОВАННЫЙ

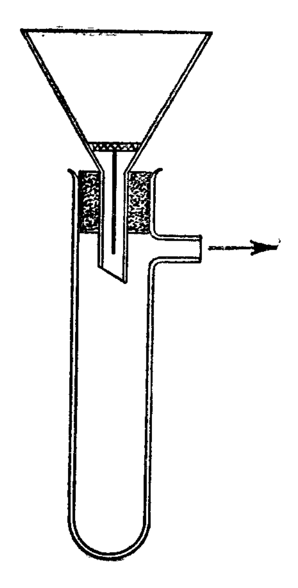


Рис. 26. Пробирка с отводом для фильтрования раствора хлористого палладия.

В регенерированном катализаторе определяют содержание палладия весовым методом.

Для этого точную навеску регенерированного хлористого палладия в количестве 0,3—0,5 г растворяют в 3 мл 2 н. раствора HCl в небольшом стеклянном стакане при нагревании на водяной бане. Раствор осторожно фильтруют в пробирку с отводом через воронку, в конус которой вложена вставка (рис. 26), декантируя раствор с нерастворившегося осадка. Фильтрат переносят в фарфоровую чашку. Осадок на вставке промывают 2 мл 2 н. раствора HCl и 5 мл горячей воды. Промывные воды присоединяют к фильтрату и нейтрализуют насыщенным раствором соды до появления оранжевой окраски по метиловому оранжевому. Добавляют 2 мл 10% водного раствора муравьинокислого натрия и закрывают чашку часовым стеклом. Содержимое чашки нагревают 30 минут на водяной бане до прекращения выделения газов. При этом происходит следующая реакция:

$$PdCl_2 + 2HCOONa \rightarrow 2NaCl + 2CO_2 + Pd + H_2.$$

Осадок фильтруют через беззольный фильтр, промывают 100 мл горячей воды, переносят в прокаленный до постоянного веса и взвешенный тигель, озоляют вначале на электроплитке, а затем прокаливают в муфельной печи до постоянного веса. Охлаждают тигель в эксикаторе над серной кислотой.

Содержание палладия в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{A \cdot 100}{a},$$

где A — вес золы в г;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОКСИЛА В АЛИФАТИЧЕСКОЙ ЦЕПИ

Описание принципа метода см. в определении пиридоксина [Хохберг, Мельник, Озер (Hochberg, Melnick, Oser, 1944)].

Навеску вещества в количестве около 0,05 г растворяют в 50 мл воды, прибавляют 0,5 мл HCl (уд. вес 1,19), 1 мл 0,1 н. раствора $NaNO_2$, перемешивают и оставляют на 10 минут. Из полученной смеси отбирают 0,1 мл, прибавляют 1 мл раствора борной кислоты, 2 мл аммонийного буфера, 1 мл раствора 2,6-дихлорхинонхлоримида, 2 мл бутилового спирта и смесь тщательно перемешивают. При этом в слое бутилового спирта не должна развиваться синяя окраска.

ВИТАМИН B_6 (ПИРИДОКСИН)

(2-метил-3-окси-4.5-диоксиметилпиридин)

Пиридоксин, или витамин B_6, является антидерматическим фактором, имеет чрезвычайно большое значение в нормальном обмене веществ.

В естественных объектах находятся в виде сопряженно действующей системы пиридоксин-пиридоксаль-пиридоксамин и в виде фосфорных эфиров включается в качестве кофермента в состав важнейших ферментов переаминирования:

Пиридоксин (4-CH_2OH, 3-HO, 5-CH_2OH, 2-H_3C, N) — Пиридоксаль (4-COH, 3-HO, 5-CH_2OH, 2-H_3C, N) — Пиридоксамин (4-CH_2NH_2, 3-HO, 5-CH_2OH, 2-H_3C, N)

Физико-химические свойства пиридоксина

Показатель	Характеристика
Состояние вещества	Бесцветные кристаллы
Формула	$C_8H_{11}O_3N$ HCl (гидрохлорид)
Молекулярный вес	170. Гидрохлорид — 205,65
Температура плавления	160°. Гидрохлорид 203—206° (разл.)
Растворимость	1 г гидрохлорида растворяется в 4,5 мл воды или 90 мл этанола при 20°
pH водного раствора	3,0—3,2 (гидрохлорид)
Максимум абсорбции	270—370 mμ (в 0,01 н. HCl)

Пиридоксин выпускается в виде гидрохлорида. Методы его анализа основаны на определении по галоиду визуальным или потенциометрическим титрованием и колориметрическом определении по OH-группе. Промышленными препаратами витамина B_6 является кристаллический продукт, его водные растворы, а также драже и таблетки с витамином B_6 и другими витаминами.

ОБЪЕМНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ[1]

Осуществляется одним из следующих способов: около 0,1 г препарата (точная навеска) растворяют в воде в мерной колбе емкостью 50 мл и доводят до метки водой. К 20 мл этого раствора прибавляют 2—3 капли индикатора бромтимолового синего и титруют из микробюретки 0,1 н. раствором едкого натра до первого появления голубой окраски раствора.

Расчет процентного содержания гидрохлорида пиридоксина в препарате (x) производят по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0,02056 \cdot v_1 \cdot 100}{a \cdot v_2},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;
0,02056 — количество пиридоксина гидрохлорида, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора NaOH, в г;
a — навеска в г;
v_1 — объем разведения в мл;
v_2 — количество раствора, взятое на титрование, в мл;
100 — пересчет в %.

Около 0,06 г препарата (точная навеска) растворяют в 10—15 мл воды, прибавляют 1 каплю разведенной азотной кислоты, 8—10 капель раствора дифенилкарбазона и титруют из микробюретки 0,1 н. раствором нитрата окисной ртути до перехода желтой окраски в светло-сиреневую.

Содержание пиридоксина в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0,02056 \cdot 100}{a}.$$

Обозначения см. выше.

[1] По IX Госфармакопее СССР.

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

(метод разработан О. С. Шерман и Е. И. Гершкович)

Точную навеску гидрохлорида пиридоксина в количестве около 0,2 г растворяют в 30 мл воды, прибавляют 2 мл 0,1 н. раствора HCl и при постоянном перемешивании титруют 0,1 н. раствором NaOH. Запись показаний

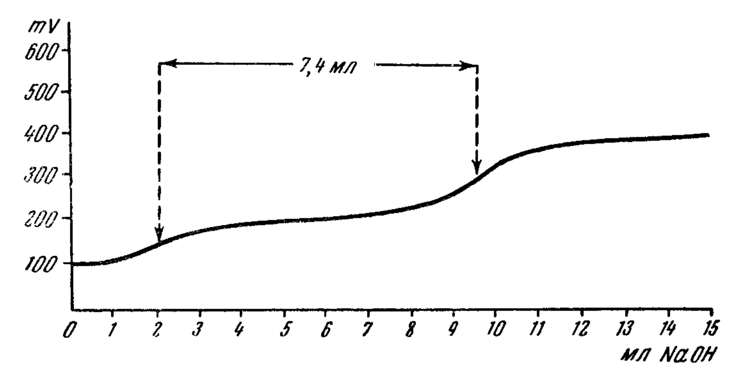


Рис. 27. Кривая потенциометрического титрования гидрохлорида пиридоксина.

гальванометра производят после добавления каждых 0,5 мл, а в областях скачков потенциала — через 0,2—0,3 мл.

На графике по оси абсцисс откладывают количество миллилитров израсходованной щелочи, а по ординате — показания гальванометра в милливольтах (рис. 27).

Содержание гидрохлорида пиридоксина рассчитывают по числу миллилитров щелочи, израсходованной между 1-м и 2-м скачками потенциала.

Расчет процентного содержания пиридоксина в препарате (x) производят по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0{,}02056 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, израсходованное между 1-м и 2-м скачками потенциала, в мл;

0,02056 — количество пиридоксина, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;

100 — пересчет в %;

a — навеска в г.

РЕАКЦИЯ ИДЕНТИЧНОСТИ

В основу реакции положен метод Хохберга, Мельника, Озер и Скуди (Hochberg, Melnick, Oser и Scudi), сущность которого заключается в том, что пиридоксин, реагируя с 2,6-дихлорхинонхлоримидом, образует синий индофенол по схеме:

Установлено, что эта реакция является достаточно избирательной для пиридоксина, так как только те фенолы реагируют с 2,6-дихлорхинонхлоримидом, образуя окрашенный индофенол, которые имеют открытое параположение к фенольному гидроксилу. В присутствии же солей бора эта реакция не идет, так как бор связывает OH-группу пиридоксина, образуя боратный комплекс, вследствие чего фенольный характер пиридоксина маскируется:

Связывание солями бора гидроксильной группы пиридоксина использовали О. С. Шерман и Е. И. Гершкович в качестве метода идентификации (определения подлинности пиридоксина).

Навеску пиридоксина в количестве около 0,05 г растворяют в 50 мл воды, отбирают 0,1 мл полученного раствора, прибавляют 1 мл воды, 2 мл аммонийного буфера, 1 мл раствора 2,6-дихлорхинонхлоримида, 2 мл бутанола и смесь энергично встряхивают. При этом в бутаноловом слое должно развиться синее окрашивание. В параллельной пробе к 0,1 мл испытуемого раствора прибавляют 1 мл раствора борной кислоты, 2 мл аммонийного буфера, 1 мл раствора 2,6-дихлорхинонхлоримида, 2 мл бутанола и смесь энергично встряхивают. При этом в бутаноловом слое не должно развиться синее окрашивание.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСИ МЕТИЛОВОГО ЭФИРА ПИРИДОКСИНА

Поскольку в метиловом эфире пиридоксина в 5-м положении находится OCH_3-группа, он не способен реагировать, подобно пиридоксину, с борной кислотой и образовывать борный комплекс, не дающий реакции образования индофенола с 2,6-дихлорхинонхлоримидом. На этом свойстве основан способ определения примеси метилового эфира пиридоксина в препарате пиридоксина, предложенный Л. А. Петровой.

Составление калибровочного графика

Приготовляют растворы, содержащие в 1 мл следующие количества пиридоксина и его метилового эфира (табл. 6).

Подготавливают 6 капельных воронок емкостью 25—50 мл. В каждую из них вносят по 1 мл растворов № 1—6, по 2 мл 5% водного раствора борной кислоты, по 2 мл буферного аммиачного раствора, по 1 мл раствора 2,6-дихлорхинонхлоримида и 2 мл бутилового спирта. Смесь в воронках тщательно встряхивают в течение 1 минуты и дают разделиться слоям. Бутаноловый слой сливают в пробирки № 1—6 через бумажные фильтры с небольшим количеством свежепрокаленного сернокисло-

Таблица 6

Шкала растворов пиридоксина и метилового эфира

№ раствора	Содержание в 1 мл в γ	
	хлоргидрата пиридоксина	метилового эфира пиридоксина
1	100,0	—
2	99,0	1,0
3	98,0	2,0
4	97,0	3,0
5	96,0	4,0
6	95,0	5,0

го натрия. Обработку растворов производят последовательно с таким расчетом, чтобы измерение окраски на электрофотоколориметре проводилось спустя 10 минут от начала опыта. Измерение производят со светофильтром, имеющим $\lambda = 680$ mμ. Установку прибора на нуль производят с реактивами. На основании показаний гальванометра прибора строят калибровочный график общепринятым способом.

Техника метода. 1 мл испытуемого раствора, содержащего смесь пиридоксина и его метилового эфира, помещают в капельную воронку и обрабатывают описанным выше способом. По калибровочному графику находят процентное содержание примеси метилового эфира.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРИДОКСИНА В ДРАЖЕ, ТАБЛЕТКАХ И ДРУГИХ ПРЕПАРАТАХ С ОДНИМ ИЛИ НЕСКОЛЬКИМИ ВИТАМИНАМИ

(метод разработан В. А. Девятниным и Г. А. Федоровой (1961) на основе способа Хохберга, Мельника, Озер, Скуди и др.)

Навеску порошка растертых таблеток в количестве около 1 г (при содержании в таблетках до 2 мг пиридоксина) или около 0,4 г (при содержании 5—10 мг) размешивают в небольшом количестве 0,5% соляной кислоты

в мерной колбе емкостью 100 мл, доводят до метки этой же кислотой, перемешивают и фильтруют. 2 мл фильтрата помещают в мерную колбу емкостью 50 мл, доводят соляной кислотой до метки и перемешивают. 4 мл полученного раствора переносят в кювету фотоколориметра, добавляют 7 мл 0,5% раствора соляной кислоты, 1 мл воды, 5 мл изопропилового спирта, 2 мл аммонийного буферного раствора и перемешивают. Затем добавляют 1 мл раствора 2,6-дихлорхинонхлоримида и вновь осторожно перемешивают. Через 1—1 1/2 минуты измеряют оптическую плотность раствора на фотоколориметре с красным светофильтром ($\lambda = 680$ mμ) в кювете с толщиной слоя 3 см.

Одновременно ставят контрольный опыт: в кювету фотоколориметра помещают 4 мл испытуемого раствора и далее поступают, как описано выше, добавляя вместо 1 мл воды 1 мл 5% раствора борной кислоты.

Содержание пиридоксина в миллиграммах в 1 шт. испытуемого препарата (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{c \cdot v \cdot d}{a \cdot 1000},$$

где c — содержание пиридоксина, найденное по калибровочному графику, в мг;
a — навеска в г;
v — разведение в мл;
d — средний вес 1 таблетки в г.

Составление калибровочного графика 0,0125 г пиридоксина гидрохлорида помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, растворяют в 0,5% растворе соляной кислоты, доводят этой же кислотой до метки и перемешивают (основной раствор стандарта). Раствор хранят в склянке темного стекла с притертой пробкой при 4°. Устойчив в течение 1 месяца.

2 мл основного раствора вносят в мерную колбу емкостью 50 мл и доводят до метки 0,5% раствором соляной кислоты (рабочий раствор стандарта). Из полученного раствора готовят серию растворов в соотношениях, указанных в табл. 7, и через 1—1 1/2 минуты измеряют окраску растворов, как указано выше.

Для построения калибровочного графика на оси абсцисс откладывают количества пиридоксина в миллиграммах, а на оси ординат — соответствующие им оптические плотности. Правильно построенный график должен иметь вид прямой линии и проходить через точки калибровочного графика и через точку пересечения ординат.

Таблица 7

Приготовление стандартных растворов

№ п/п	Объем в мл						Общий объем в мл	Содержание пиридоксина в γ
	рабочего раствора стандарта	0,5% HCl	воды	изопропилового спирта	аммонийного буферного раствора	раствора 2,6-дихлорхинонхлоримида		
1	1,0	10,0	1,0	5,0	2,0	1,0	20	5
2	2,0	9,0	1,0	5,0	2,0	1,0	20	10
3	3,0	8,0	1,0	5,0	2,0	1,0	20	15
4	4,0	7,0	1,0	5,0	2,0	1,0	20	20
5	5,0	6,0	1,0	5,0	2,0	1,0	20	25
6	6,0	5,0	1,0	5,0	2,0	1,0	20	30

Методы контроля в синтезе витамина B_c (фолиевой кислоты)[1]

ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА

$$HOOC-CH_2-CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH$$

$C_5H_9O_4N$

М. вес 147,13

Белый кристаллический порошок кислого вкуса, трудно растворимый в спирте и холодной воде. Хорошо растворяется в горячей воде, разбавленных кислотах и щелочах; нерастворим в эфире. Т. пл. 189°, уд. вращ. 5% раствора в 2,5% HCl = +30,0—32,5.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОРМОЛЬНО-ТИТРУЕМОГО АЗОТА

Около 0,25 г препарата (точная навеска) растворяют в 20 мл дистиллированной, лишенной CO_2, воды при слабом нагревании (не доводя до кипения). К охлажденному раствору добавляют 3 капли индикатора нейтрального красного и титруют 0,2 н. раствором KOH или NaOH до первого изменения окраски в оранжевый цвет. Прибавляют 10 мл формольной смеси и титруют 0,2 н. раствором щелочи до появления ясного красного окрашивания, одинакового с окраской контрольного опыта.

Одновременно готовят контрольный опыт из 20 мл дистиллированной, лишенной CO_2, воды, к которой прибавлено 3 капли индикатора нейтрального красного, 10 мл формольной смеси и 0,1 мл 0,2 н. раствора щелочи. К концу титрования уравнивают объем контроля, добавляя к нему столько воды, сколько было затрачено 0,2 н. раствора щелочи на титрование испытуемого.

Содержание азота в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v-0,1)\cdot 0,02943\cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,2 н. раствора щелочи, пошедшее на титрование испытуемого раствора, в мл;

0,1 — количество точного 0,2 н. раствора щелочи, добавленное в контрольный опыт, в мл;

0,02943 — количество глутаминовой кислоты, соответствующее 1 мл точного 0,2 н. раствора щелочи, в г;

a — навеска в г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УДЕЛЬНОГО ВРАЩЕНИЯ

Около 1,25 г препарата (точная навеска) растворяют в пикнометре емкостью 25 мл, в 20 мл 2,5% раствора HCl и помещают в термостат при 20° на 1 час. Раствор доводят до метки той же кислотой, перемешивают и определяют в поляриметре угол вращения при длине трубки в 2 дм.

Удельное вращение определяют по формуле:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{25\cdot a}{l\cdot c},$$

где l — длина трубки в дм;

c — количество глутаминовой кислоты в 25 мл раствора в г;

a — наблюдаемый угол вращения.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ

Определение проводят в незапаянном капилляре в приборе Рота. Скорость повышения температуры должна составлять 4—5° в 1 минуту. Капилляр с веществом вносят в прибор при температуре 175—180°.

[1] Излагаются по регламенту ВНИВИ

КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ

Свободный аммиак

0,5 г препарата помещают в коническую колбу емкостью 50 мл. с притертой пробкой, прибавляют 12,5 мл ледяной CH_3COOH, взбалтывают 5 минут и фильтруют через складчатый фильтр. К 5 мл фильтрата прибавляют 3 мл 0,1 н. раствора $NaNO_2$ и взбалтывают. Отбирают из полученного раствора 2 мл и прибавляют их к 5 мл щелочного раствора бета-нафтола и взбалтывают. При этом не должно возникать розового окрашивания.

Связанный анилин

0,5 г препарата растворяют в конической колбе емкостью 50—100 мл в 5 мл разбавленной (1:1) HCl и кипятят на сетке в течение $1^1/_2$ часов с обратным холодильником. По охлаждении раствор нейтрализуют по лакмусу 30% раствором NaOH (около 3 мл) и доводят до 12,5 мл ледяной уксусной кислотой. После перемешивания отбирают 5 мл раствора, прибавляют 3 мл 0,1 н. раствора $NaNO_2$, перемешивают и к 2 мл полученного раствора прибавляют 5 мл щелочного раствора бета-нафтола. Не должно появляться розовое окрашивание.

Соли аммония и диэтиламин

0,2 г препарата с 3 мл 10% раствора щелочи не должны вызывать посинения красной лакмусовой бумажки при кипячении этого раствора в течение 10—15 секунд.

ХЛОРГИДРАТ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

COOH — CH_2 — CH_2 — CH — COOH·HCl (при CH — NH_2)

$C_5H_{10}O_4NCl$
М. вес 183,6

Белый порошок кислого вкуса. Хорошо растворим в воде и спирте.

Количественное определение. Около 0,8 г препарата (точная навеска) растворяют в мерной колбе емкостью 100 мл в 60—70 мл свежепрокипяченной и охлажденной воды, доводят водой до метки и перемешивают. Отбирают по 25 мл в две конические колбы емкостью 100—150 мл. В одну из колб прибавляют 2—3 капли фенолового красного и титруют 0,1 н. раствором NaOH до четкого розового окрашивания. В другую колбу добавляют 2 мл 10% раствора азотной кислоты, 20 мл 0,1 н. раствора азотнокислого серебра и титруют 0,1 н. раствором роданистого аммония в присутствии железоаммониевых квасцов до появления розового окрашивания.

Содержание хлоргидрата глутаминовой кислоты в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1)\cdot 4\cdot 0,01836\cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, пошедшее на титрование, в мл;
0,01836 — фактор пересчета на хлоргидрат глутаминовой кислоты;
100 — пересчет в %;
a — навеска в г;
4 — часть навески, взятая на титрование.

2, 4-ДИАМИНО-5-ИЗОНИТРОЗО-6-ОКСИПИРИМИДИН

O, NOH, N, H_2N, N (структурная формула)

$C_4H_5N_5O_2$
М. вес 155,124

Розоватый мелкокристаллический порошок. При обычной температуре практически не растворим в воде, спирте и в растворах кислот. Слабо растворим в разбавленных растворах щелочей.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСИ 2,4-ДИАМИНО-6-ОКСИПИРИМИДИНА

Около 0,1 г изонитрозосоединения (точная навеска) растирают с 10 мл воды, приливают 10 мл 1 н. раствора NaOH, 180 мл горячей (40—50°) воды и растворяют навеску. Приливают 20 мл 20% раствора H_2SO_4 и нитрозируют 0,1 н. раствором $NaNO_2$ при комнатной температу-

ре до появления синего пятна на йодокрахмальной бумаге при выдержке 5 минут.

Параллельно ставят контрольный опыт. Количество раствора $NaNO_2$, пошедшее на титрование контрольного опыта, вычитают из количества раствора $NaNO_2$, затраченного при нитрозировании навески.

Расчет процентного содержания 2,4-диамино-6-оксипиридина (x) производят по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0{,}0126 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора $NaNO_2$, пошедшее на нитрозирование навески, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора $NaNO_2$, израсходованное на контрольный опыт, в мл;
0,0126 — фактор пересчета на 2,4-диамино-6-оксипиримидин;
100 — пересчет в %;
a — навеска в г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 2,4-ДИАМИНО-5-ИЗОНИТРОЗО-6-ОКСИПИРИМИДИНА

Около 0,1 г препарата (точная навеска) помещают в колбу Кьельдаля емкостью 100 мл, прибавляют растертую в порошок смесь из 1 г сульфата калия, 0,3 г сульфата меди и 0,5 г глюкозы, приливают 10 мл концентрированной H_2SO_4 и сжигают до обесцвечивания раствора. Далее поступают, как описано в анализе ацетонитрила. Параллельно ставят контрольный опыт на реактивы.

Расчет процентного содержания изонитрозосоединения (x_1) производят по формуле:

$$x_1 = \frac{(v - v_1) \cdot 0{,}003102 \cdot 10}{a} - x \cdot 0{,}984,$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование контрольного опыта, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование аммиака, в мл;
0,003102 — фактор пересчета на изонитрозосоединение;
100 — пересчет в %;
x — процентное содержание примеси диаминооксипиримидина;
0,984 — фактор пересчета диаминопиримидина на изонитрозосоединение;
a — навеска в г.

2, 4, 5-ТРИАМИНО-6-ОКСИПИРИМИДИН-ДИХЛОРГИДРАТ

$C_4H_7ON_5 \cdot 2HCl$
М. вес 214,07

Хорошо растворим в воде. Его растворимость уменьшается в присутствии соляной кислоты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

0,22—0,23 г препарата (точная навеска) растворяют в 50 мл воды, приливают 25 мл 0,1 н. раствора йода и по истечении 1 минуты титруют 0,1 н. раствором тиосульфата натрия в присутствии крахмала.

Параллельно ставят контрольный опыт на реактивы.

Содержание дихлоргидрата 2,4,5,-триамино-6-оксипиримидина в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0{,}0107 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, пошедшее на титрование контрольного опыта, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, пошедшее на титрование навески, в мл;
0,0107 — фактор пересчета на дихлоргидрат триаминооксипиримидина;
100 — пересчет в %;
a — навеска в г.

13 В А Девятнин

2, 4, 5-ТРИАМИНО-6-ОКСИПИРИМИДИН-СУЛЬФАТ

$C_4H_7ON_5SO_4$ М. вес 237,07

2,4,5-триамино-6-оксипиримидин-сульфат получают при каталитическом гидрировании 2,4-диамино-5-изонитрозо-6-оксипиримидина со скелетным никелевым катализатором в щелочной среде. После гидрирования основание выделяют в виде сульфата.

Методы анализа разработаны в лаборатории синтеза ВНИВИ В. М. Березовским с сотрудниками.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

0,23—0,25 г вещества (точная навеска) растворяют в 50 мл воды при нагревании на водяной бане при 50° и перемешивании до полного растворения навески. К охлажденному до комнатной температуры раствору приливают 25 мл 0,1 н. раствора йода и по истечении 1 минуты титруют 0,1 н. раствором тиосульфата натрия в присутствии крахмала.

Параллельно ставят контрольный опыт.

Содержание сульфата триаминооксипиримидина в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1)\cdot 0{,}01285\cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, пошедшее на титрование контрольного опыта, в мл;
v_1 — количество точного 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, пошедшее на титрование навески, в мл;
0,01285 — фактор пересчета на триаминооксипиримидин-сульфат;
100 — пересчет в %;
a — навеска в г.

АКРОЛЕИН

$CH_2 = CH - CHO$ C_3H_4O
М. вес 56,065

Бесцветная жидкость с т. кип. 52,5° при 760 мм, уд. вес 0,841. Хорошо смешивается с органическими растворителями, растворим в воде. Акролеин обладает слезоточивым действием и токсичностью.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

В две одинаковые склянки с притертыми пробками вносят пипеткой по 25 мл раствора гидроксиламина. В одну из склянок помещают около 0,5 г акролеина (точная навеска), взятых в ампулу. Вещество в ампулу вводят при помощи длинного капилляра, хорошо охлаждают ампулу в смеси льда с солью и, не вынимая ампулы, запаивают ее. Ампулу разбивают стеклянной палочкой под раствором гидроксиламина, смывают палочку 3 мл этилового спирта, тотчас закрывают склянку пробкой и оставляют в темноте на 2 часа. Затем в каждую склянку приливают по 10 мл воды, а в контрольный раствор гидроксиламина — еще 20 мл этилового спирта, чтобы к концу титрования анализируемые пробы имели равный объем, и затем титруют 0,5 н. спиртовым раствором КОН в присутствии метилового красного до окраски, равной нейтральному раствору гидроксиламина.

Содержание акролеина в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v\cdot 0{,}0028}{a},$$

где v — количество 0,5 н. раствора КОН, пошедшее на титрование, в мл;
0,0028 — фактор пересчета на акролеин;
a — навеска в г.

ДИБРОМПРОПИОНОВЫЙ АЛЬДЕГИД

$CH_2Br\cdot CHBr\cdot CHO$ М вес 215,86

Тяжелая, бесцветная жидкость, уд. вес 2,198. Т. кип. 79—84° (при 5—6 мм 86,4°). Легко растворим в большинстве органических растворителей. В присутствии воды гидролизуется до глицеринового альдегида. Обладает слезоточивым действием.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

В коническую колбу емкостью 100 мл, содержащую 5 мл этилового спирта, берут навеску 0,15—0,16 г вещества (точная навеска), приливают 40—50 мл 10% водного раствора КОН и кипятят с обратным холодильни-

ком в течение 2 часов Раствор количественно переносят в колбу емкостью 250—300 мл, подкисляют 20% раствором азотной кислоты, прибавляют 25 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$ и титруют 0,1 н. раствором роданистого аммония в присутствии железоаммониевых квасцов.

Параллельно ставят контрольный опыт.

Содержание дибромпропионового альдегида в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0{,}0108 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора NH_4CNS, пошедшее на титрование контрольного опыта, в мл;

v_1 — количество точного 0,1 н. раствора NH_4CNS, пошедшее на титрование навески, в мл;

0,0108 — фактор пересчета на дибромпропионовый альдегид;

100 — пересчет в %;

a — навеска в г.

П-НИТРОБЕНЗОИЛГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА

$$O_2N-C_6H_4-CONH-CH_2-CH_2-CH(COOH)-COOH \qquad C_{12}H_{12}O_7N_2 \quad M \text{ вес } 296{,}244$$

Бесцветные пластинки. Т. пл. 114—116°; $[\alpha]_D^{20} = 16{,}02$ (2% раствор в 2 н NaOH) В воде растворяется умеренно, при нагревании легче, так же и в спирте; нерастворим в эфире.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

Около 0,4 г хорошо растертого вещества (точная навеска) помещают в коническую колбу емкостью 150 мл, в колбу вставляют воронку с укороченной трубкой, через которую пропускают стеклянную палочку. К навеске приливают 150 мл разбавленной HCl (1:2,5) и постепенно, в три приема, прибавляют 1 г цинковой пыли. Содержимое колбы при этом часто перемешивают. Когда выделение газа очень замедляется, приливают 10 мл HCl

(уд. вес 1,19) и прибавляют еще 1 г цинковой пыли. Перед прибавлением соляной кислоты проверяют, все ли вещество полностью растворилось. Если имеются крупные крупинки нерастворенного вещеетва, их растворяют растиранием палочкой. Когда выделение газа почти прекратится, воронку смывают водой, жидкость фильтруют через ватный тампон в стакан для диазотирования. Колбу, в которой производилось восстановление, промывают водой, сливая ее также на ватный фильтр, который затем промывают водой, употребляя в общей сложности 150 мл воды. К фильтрату прибавляют 2 г бромистого калия и диазотируют при 10—12° 0,1 *М* раствором $NaNO_2$ до появления на иодокрахмальной бумаге четкого синего пятна. При выдержке 5 минут параллельно ставят контрольный опыт и количество 0,1 *М* раствора нитрита натрия, затраченное на этот опыт, вычитают из числа миллилитров 0,1 *М* раствора нитрита натрия, затраченного на диазотирование навески.

1 мл 0,1 *М* раствора нитрита натрия соответствует 0,02962 г п-нитробензоилглутаминовой кислоты и 0,01671 г п-нитробензойной кислоты.

Содержание п-нитробензоилглутаминовой кислоты в процентах (x_1) вычисляют по формуле:

$$x_1 = \frac{[(100 - c)\ a \cdot 0{,}02962] - (100\ v \cdot 0{,}02962 \cdot 0{,}01671)}{a \cdot (0{,}02962 - 0{,}01671)},$$

где v — количество точного 0,1 *М* раствора $NaNO_2$, пошедшее на диазотирование навески, в мл;

c — процентное содержание примеси (NaCl) и потеря при высушивании;

a — навеска в г.

Содержание п-нитробензойной кислоты в процентах (x_2) вычисляют по формуле:

$$x_2 = \frac{(100\ v \cdot 0{,}02962\ 0{,}01671) - [a \cdot (100 - c)\ 0{,}01671]}{a \cdot (0{,}02962 - 0{,}01671)},$$

Обозначения те же.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРИСТОГО НАТРИЯ

Около 0,5 г (точная навеска) хорошо растертой п-нитробензоилглутаминовой кислоты высушивают при 50—55° до постоянного веса, затем растворяют навеску

в 100 мл теплой воды, прибавляют 10 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$, подкисляют раствор 2 мл 10% раствора азотной кислоты и титруют 0,1 н. раствором NH_4CNS в присутствии железоаммониевых квасцов.

Содержание NaCl в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0,005846 \cdot 100}{a} \cdot \frac{100 - b}{100},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора $AgNO_3$, пошедшее на титрование, в мл;
0,005846 — фактор пересчета на хлористый натрий;
100 — пересчет в %;
a — навеска в г;
b — потеря при высушивании, выраженная в %.

П-АМИНОБЕНЗОИЛГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА

$H_2N-C_6H_4-CONH-CH_2-CH_2-CH(COOH)-COOH$

$C_{12}H_{14}O_5N_2$
М. вес 266,26

Бесцветные иглы, собранные в пучки. Т. пл. 166—167°. Умеренно растворима в воде, плохо — в органических растворителях.

$[\alpha]_D^{20} = +27,4$ (2% раствор в 2 н. NaOH).

Определение в водном растворе 5 мл раствора, содержащего п-аминобензоилглутаминовую кислоту, помещают в стакан, прибавляют 25 мл 20% HCl, 60 мл воды, 1,5—2,0 г бромистого калия и диазотируют при 10—14° 0,1 *М* раствором $NaNO_2$ с йодокрахмальной бумагой. Выдержка 5 минут. Параллельно ставят контрольный опыт.

Содержание п-аминобензоилглутаминовой кислоты в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0,0266 \cdot 100}{5},$$

где v — количество 0,1 *М* раствора $NaNO_2$, пошедшее на титрование навески, в мл;
v_1 — количество 0,1 *М* раствора $NaNO_2$, пошедшее на титрование контрольного опыта, в мл;

0,0266 — фактор пересчета на п-аминобензоилглутаминовую кислоту;
100 — пересчет в %;
5 — количество испытуемого раствора в мл.

ВИТАМИН B_c (ФОЛИЕВАЯ КИСЛОТА)

N-4-{[(2-АМИНО-4-ОКСИ-ПТЕРИДИЛ)-МЕТИЛ]-АМИНО}-БЕНЗОИЛГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА

Фолиевая кислота, витамин B_c, является антианемическим фактором, называется также р-аминобензоилглутаминовой или птероилглутаминовой кислотой.

(2-амино-4-окси-птеридин, H_2N, N, N, N, N, OH)$-CH_2-NH-C_6H_4-CONH-CH(COOH)-CH_2-CH_2-COOH$

В положении 6 в молекуле фолиевой кислоты могут быть разные группировки; глутаминовых остатков в мо-

Физико-химические свойства фолиевой кислоты

Показатель	Характеристика
Состояние вещества	Желтые гигроскопические кристаллы
Формула	$C_{19}H_{19}O_6N_7$
Молекулярный вес	441,4
Температура плавления	Не установлена
Растворимость	Не растворима в воде, спирте и органических растворителях Растворяется в разбавленных щелочах и кислотах
Максимум абсорбции (для раствора в 0,1 н. NaOH)	256 mμ ($E_{1\,см}^{1\%} = 590$); 282 mμ ($E_{1\,см}^{1\%} = 570$); 365 mμ ($E_{1\,см}^{1\%} = 206$) При разведении 1 : 600 $\frac{E_{1\,см}^{1\%}\ 256\ m\mu}{E_{1\,см}^{1\%}\ 365\ m\mu} = 2,8 - 3,0$
Флуоресценция	Голубая у продуктов окисления
Абсорбционный максимум флуоресценции продуктов окисления	470 mμ

лекуле фолиевой кислоты, находящейся в естественных продуктах, может быть от 1 до 7.

Промышленными препаратами фолиевой кислоты является кристаллический продукт, а также натриевая соль фолиевой кислоты, драже и таблетки, содержащие фолиевую кислоту.

Фолиевая кислота не обладает флуоресценцией, но продукты распада, возникающие в результате ее окисления, приобретают способность флуоресцировать голубым светом. На этом свойстве фолиевой кислоты основаны некоторые методы ее химического определения.

В растворе соляной кислоты фолиевая кислота может восстанавливаться цинковой пылью. Освобождающаяся аминокислота (I) диазотируется нитритом натрия, полученная соль диазония (II) сочетается с N-(1-нафтил)-этилендиамином дигидрохлоридом (III) в присутствии сульфамата аммония ($NH_2SO_2ONH_4$) или мочевины ($NH_2 \cdot CO \cdot NH_2$). Образуется фиолетовая окраска раствора, интенсивность которой пропорциональна концентрации и может служить для целей количественного определеиия.

Химизм протекающих в описанном методе реакций может быть представлен следующим образом:

H_2N, N, N, N, N, OH — $CH_2 - NH -$ (бензольное кольцо) $- CONH - \overset{H}{C}(COOH) - CH_2 - CH_2 -$

$- COOH \xrightarrow{+H} H_2N -$ (бензольное кольцо) $- COOH + R$

$H_2N -$ (бензольное кольцо) $- COOH \xrightarrow[HCl]{NaNO} N \equiv \overset{+}{N}(Cl) -$ (бензольное кольцо) $- COOH$

I

$N \equiv N(Cl) -$ (бензольное кольцо) $- COOH +$ (нафталин) $- NH - CH_2 - CH_2 - NH_2 \longrightarrow$

II III

HOOC — (бензольное кольцо) $- N = N -$ (нафталин) $- NH - CH_2 - CH_2 - NH_2$

Этот метод принят в XV издании Фармакопеи США [1] и в некоторой модификации принят для МРТУ на витаминные препараты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ПРОДУКТЕ

Составление калибровочного графика 0,05 г п-аминобензойной кислоты (т. пл. 186—187°, с содержанием не ниже 99%) отвешивают в стакан емкостью 15—20 мл и растворяют в спирте. Раствор переносят в мерную колбу емкостью 50 мл, стакан промывают несколько раз спиртом (общее количество спирта 25 мл), раствор доводят в колбе водой до метки и перемешивают: 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу емкостью 250 мл, туда же прибавляют 175 мл воды, 45 мл разведенной HCl, 2,5 мл раствора желатины, доводят до метки водой и перемешивают. В 1 мл раствора содержится 0,004 мг п-аминобензойной кислоты.

В 5 колб емкостью 15—20 мл помещают отмеренные пипеткой 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 и 2,5 мл приготовленного раствора и доводят объем в каждой колбе до 5 мл водой. В каждую колбу добавляют по 1 мл разведенной HCl, по 1 мл 0,1% раствора нитрита натрия, хорошо перемешивают и оставляют на 5 минут. Затем в каждую колбу приливают по 1 мл 12% водного раствора мочевины, перемешивают и вновь оставляют на 5 минут. В каждую колбу добавляют по 1 мл 0,1% водного раствора N-(1-нафтил)-этилендиамина дигидрохлорида, по 6 мл воды, перемешивают и точно через 10 минут измеряют оптическую плотность растворов на электрофотоколориметре со светофильтром 550 mμ (зеленый) в кюветах с толщиной слоя 3 см. Для построения калибровочного графика на оси абсцисс откладывают количество парааминобензойной кислоты в миллиграммах, а на оси ординат наносят показания гальванометра. График должен иметь вид прямой линии.

Определение свободной и связанной п-аминобензоилглутаминовой кислоты. Точную навеску препарата в количестве 0,049—0,050 г отвешивают в стакане емкостью 15—20 мл, смачивают несколькими каплями воды и рас-

[1] United State of Pharmacopoeia, XV ed.

творяют в 0,1 н. растворе NaOH. Раствор переносят в мерную колбу емкостью 50 мл, стакан промывают несколько раз 0,1 н. раствором NaOH, сливая промывную жидкость в ту же колбу, объем раствора доводят 0,1 н. раствором NaOH до метки и хорошо перемешивают. Из полученного раствора отбирают 1 мл в мерную колбу емкостью 100 мл, добавляют 75 мл воды, 18 мл разведенной HCl, 1 мл раствора желатины, доводят до метки водой и перемешивают (раствор А).

Переносят 70 мл раствора А в коническую колбу емкостью 150 мл, прибавляют 0,5 г цинковой пыли и оставляют на 15 минут при частом перемешивании раствора. Раствор фильтруют через сухой фильтр в сухую колбу, отбрасывая первые 15—20 мл фильтрата. Из фильтрата отбирают 2 мл, переносят в колбу емкостью 15—20 мл, прибавляют 3 мл воды, 1 мл разведенной HCl и далее поступают, как указано выше (начиная со слов: «1 мл 0,1% раствора нитрита натрия...»).

Определение свободной п-аминобензоилглутаминовой кислоты. Переносят 2 мл раствора А в колбу емкостью 15—20 мл, добавляют 3 мл воды, 1 мл разведенной соляной кислоты и далее поступают, как описано при определении общего количества п-аминобензоилглутаминовой кислоты, начиная со слов: «1 мл 0,1% водного раствора нитрита натрия...»

Вычисление содержания фолиевой кислоты в препарате. Из показателя плотности, соответствующего содержанию общей п-аминобензоилглутаминовой кислоты, вычитают показатель плотности, соответствующий свободной п-аминобензоилглутаминовой кислоте, и по калибровочному графику находят содержание связанной п-аминобензоилглутаминовой кислоты в испытуемом растворе в миллиграммах.

Содержание фолиевой кислоты в препарате в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{c \cdot 50 \cdot 100 \cdot 3{,}22 \cdot 100}{1 \cdot 2 \cdot a \cdot 1000},$$

где c — содержание фолиевой кислоты, найденное по калибровочному графику, в мг;
a — навеска в г;
50 — объем первого разведения в мл;
100 — объем второго разведения в мл;
1 — количество раствора первого разведения, взятое для второго разведения, в мл;
2 — количество раствора первого разведения, взятое на определение, в мл;
3,22 — постоянный коэффициент;
100 — пересчет в %;
1000 — пересчет в г.

При сокращении формула приобретает следующее значение:

$$x = \frac{c \cdot 250 \cdot 3{,}22}{a}.$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В ТАБЛЕТКАХ С ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТОЙ И ДРУГИМИ ВИТАМИНАМИ[1]

Точную навеску порошка растертых таблеток около 5 г (при содержании в 1 таблетке 1 мг фолиевой кислоты) или около 2,5 г (при содержании 2 мг фолиевой кислоты) помещают в стакан емкостью 50 мл, смачивают небольшим количеством воды и растворяют в 10 мл 0,1 н. раствора едкого натра. Раствор переносят в мерную колбу емкостью 50 мл, промывают стакан несколько раз 0,1 н. раствором едкого натра, сливая его в ту же колбу, объем раствора в колбе доводят 0,1 н. раствором едкого натра до метки, тщательно перемешивают и фильтруют, отбрасывая первые порции фильтрата.

1 мл фильтрата переносят в мерную колбу емкостью 100 мл и далее поступают, как описано при определении свободной и связанной п-аминобензоилглутаминовой кислоты, начиная со слов: «добавляют 75 мл воды...» и т. д. Содержание фолиевой кислоты в миллиграммах в 1 таблетке (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(c - c_1) \cdot 50 \cdot 100 \cdot 3{,}22 \cdot d}{a \cdot 1 \cdot 2},$$

где c — содержание суммы свободной и связанной п-аминобензоилглутаминовой кислоты в мл;
c_1 — содержание свободной п-аминобензоилглутаминовой кислоты в мг;
a — навеска в г;
50 и 100 — разведение в мл;
d — средний вес 1 таблетки в г;
1; 2; 3,22 — см. выше.

[1] МРТУ-42 № 2839—61.

Методы контроля в производстве витамина B_{12}

Витамин B_{12}, цианокобаламин, является антианемическим фактором. В естественных продуктах присутствует ряд аналогов цианокобаламина; некоторые из них не являются биологически активными соединениями. Бернхауер и Фридрик (цит. по А. В. Труфанову, 1955) предложили для всех соединений, относимых к группе витаминов B_{12}, следующую классификацию:

Витамин B_{12}

- Полные кобаламины (в молекуле присутствует нуклеотидная часть)
  - Нуклеотиды (бензимидазол) → Истинные кобаламины
  - Нуклеотиды (пурины) → Псевдокобаламины
  - При pH = 7,0 (моноцианокомплексы красного цвета) Макс. $\lambda = 361$ mμ
    - Бензимидазоловые → Биологически активны для микробов и цыплят (протеиновый фактор) и человека (антианемический фактор)
    - Пуриновые → Активны только для микробов
- Неполные этикобаламины (в молекуле отсутствует нуклеотидная часть)
  - При pH = 7,0 (дицианокомплексы фиолетового цвета) Макс абсорбции $\lambda = 376$ mμ
    - Биологической активностью не обладают

Физиологическое значение витамина B_{12} для организма очень велико.

Различные формы витамина B_{12} получили в настоящее время следующие обозначения:

Витамин	B_{12}	— цианокобаламин,
»	B_{12}	— гидроксокобаламин (выделен из культуральной жидкости стрептомицетов),
»	$B_{12}b$	— гидроксокобаламин,
»	$B_{12}c$	— нитритокобаламин (выделен из культуральной жидкости стрептомицетов),
»	$B_{12}d$	— гидроксокобаламин,
»	$B_{12}f$	— выделен из фекалий различных животных,
»	$B_{12}m$	— выделен из фекалий свиньи,
Псевдовитамин	B_{12}	— выделен из содержимого рубца жвачных животных

Структурная формула витамина B_{12} (цианокобаламина) следующая:

Физико-химические свойства цианокобаламина

Показатель	Характеристика
Состояние вещества	Кристаллы фиолетово-красного цвета
Брутто-формула	$C_{63}H_{88}O_{14}N_{14}PCo$
Молекулярный вес	1355,42
Растворимость	Хорошо растворяется в воде и этаноле, не растворяется в хлороформе, эфире, ацетоне
Оптическая активность	$[\alpha]_D^{20} = -59 \pm 9$
Абсорбционный максимум	278 mμ ($E_{1\,см}^{1\%} = 115$); 361 mμ ($E_{1\,см}^{1\%} = 207$); 550 mμ ($E_{1\,см}^{1\%} = 63$)
Температура плавления	При 190—215° — потемнение; при 300°—разлагается
Биологическая активность	Для L. casei=0,000013 γ на 1 мл среды Для крыс—0,063 γ » цыплят—6 γ на 1 кг корма » человека—10—100 γ перорально » » —3 γ внутривенно

Витамин B_{12} в настоящее время получается главным образом из естественных источников (отходы производства антибиотиков, биосинтез Ac. propionicum, а также извлечение концентратов из активного ила водоочистительных станций — для целей животноводства и птицеводства).

Промышленными препаратами витамина B_{12} являются кристаллический препарат и его растворы для парентерального применения (розового цвета), биомасса, содержащая витамин B_{12}, для животноводства, а также драже и таблетки, содержащие комплекс витаминов группы В, в том числе и витамин B_{12} [1].

Существующие методы химического определения витамина B_{12} основаны главным образом на измерении абсорбции света в ультрафиолетовой части спектра.

[1] Следует указать на несовместимость витамина B_{12} с витамином С, который способствует разрушению молекулы витамина B_{12}.

Наиболее характерным для цианокобаламина является максимум абсорбции при $\lambda = 361$ mμ (рис. 28). По-видимому, большинство из известных аналогов цианокобаламина не дает характерного поглощения на этой длине волны.

Определение витамина B_{12} в естественных продуктах, из которых он выделяется, осложняется необходимостью высокой степени очистки вытяжек от посторонних примесей.

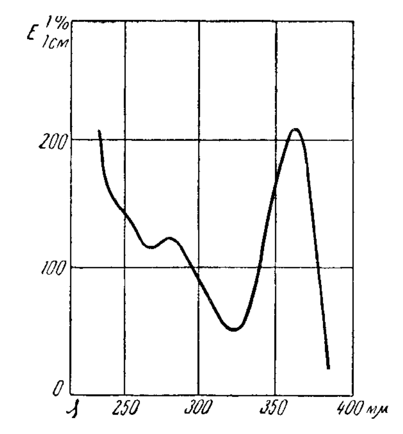


Рис. 28. Абсорбционная кривая цианокобаламина в этаноле (по Е. Кноблоху).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ПРЕПАРАТЕ

(Госфармакопея СССР, IX изд.)

Около 0,02 г препарата (точная навеска) растворяют в воде в мерной колбе емкостью 500 мл и доводят водой до метки. Определяют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 361 mμ в кювете с толщиной слоя 1 см, употребляя в качестве контрольного раствора воду.

Содержание витамина B_{12} в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{c \cdot 500 \cdot 100}{207 \cdot 100 \cdot a},$$

где c — оптическая плотность испытуемого раствора;
207 — $E_{1\,см}^{1\%} = 361$ mμ (водный раствор) чистого цианокобаламина;
a — навеска в г;
500 — разведение в мл;
100 — постоянный коэффициент;
100 — пересчет в %.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В РАСТВОРАХ

Спектрофотометрический метод

Растворы, содержащие в 1 мл 0,03 мг, и растворы, содержащие 0,1; 0,2; 0,5 или 1 мг в 1 мл, предварительно разбавленные водой в отношении 1:2, 1:4, 1:10 и 1:20, помещают в кювету спектрофотометра с толщиной слоя в 1 см и определяют оптическую плотность при длине волны 361 mμ.

Содержание цианокобаламина в миллиграммах в 1 мл (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{E \cdot 10 \cdot v}{207};$$

где v — разведение;
10 — постоянный коэффициент;
E — найденная оптическая плотность.
Остальные обозначения см. выше.

Колориметрический метод

Испытуемый раствор наливают в кювету фотоколориметра с толщиной слоя 1—2 см и находят величину оптической плотности раствора (зеленый светофильтр). По найденной величине, пользуясь калибровочным графиком, устанавливают содержание витамина B_{12} в 1 мл раствора прямым путем.

Для построения калибровочного графика берут растворы чистого кристаллического цианокобаламина, содержащие 0,02; 0,025; 0,03; 0,035; 0,04; 0,045; 0,05; 0,055; 0,065 и 0,07 мг в 1 мл и определяют оптическую плотность этих растворов.

На оси абсцисс откладывают содержание витамина B_{12}, а на оси ординат — соответствующие величины оптической плотности.



Витамин H_1, или пара-аминобензойная кислота, имеет строение:

$$H_2N-\bigcirc-COOH$$

Пара-аминобензойная кислота участвует в образовании молекулы витамина B_c, или фолиевой кислоты, а также входит в состав некоторых других соединений в растительных и животных тканях, где она и встречается преимущественно в связанном состоянии.

Физико-химические свойства витамина H_1

Показатель	Характеристика
Состояние вещества	Желтоватые, с бледно-розовым оттенком кристаллы
Формула	$C_7H_7O_2N$
Молекулярный вес	137,14
Температура плавления	185—187°
Растворимость	В 100 мл при комнатной температуре растворяется: в воде—0,34 г, в этаноле—1,3 г, в этилацетате — 7,0, в этиловом эфире — 8,2
Абсорбционный максимум	275 mμ

Промышленность выпускает синтетическую пара-аминобензойную кислоту, достаточно точно анализируемую общепринятыми методами алкалиметрического титрования.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ПРЕПАРАТЕ[1]

Точную навеску высушенной в течение 4 часов в эксикаторе над H_2SO_4 пара-аминобензойной кислоты в количестве 0,10—0,15 г растворяют в воде, подогретой до 50—60° в конической колбе. Полученный раствор титруют 0,1 н. раствором NaOH в присутствии фенолфталеина до появления розового окрашивания. Содержание пара-аминобензойной кислоты в препарате в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0{,}0137 \cdot 100}{a}$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;

0,0137 — количество пара-аминобензойной кислоты, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;

a — навеска в г.

Примечание. Раствор препарата проверяют на наличие хлор-иона по реакции с $AgNO_3$. В случае образования мути или осадка (что свидетельствует о загрязнении препарата HCl) в отдельной пробе определяют аргентометрическим путем содержание HCl. Из полученного значения процентного содержания пара-аминобензойной кислоты (x) вычитают примесь в процентах HCl.

[1] Пара-аминобензойную кислоту также анализируют методом титрования в неводных растворителях.

Методы контроля в производстве витамина С (аскорбиновой кислоты)

D-СОРБИТ



Однородный бесцветный мелкокристаллический порошок, кристаллизуется с 1 или ½ молекулой воды. Т. пл. 110° (для безводного). Очень легко растворим в воде и практически нерастворим в спирте. Может выпускаться так называемый плавленный сорбит в виде плиток, напоминающих парафин, с бледно-зеленоватым оттенком. Обладает сладким вкусом и применяется в питании диабетиков как замена сахара.

АНАЛИЗ КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО СОРБИТА

В основе метода лежит свойство D-сорбита образовывать с бензальдегидом продукт конденсации, дибензальдегид-сорбит, аморфный бесцветный продукт с т. пл.

162°. Реакция протекает в присутствии серной кислоты на холоду. Этот метод был предложен Вердером и Мартини, описан применительно к анализу растительных веществ Н. Н. Ивановым (1946) и в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ модифицирован Л. Н. Кравчиной применительно к кристаллическому продукту.

Навеску сорбита в количестве около 0,25 г отвешивают на аналитических весах в химический стакан емкостью 150 мл, добавляют 1 мл H_2SO_4 (разведенной водой в отношении 1:1) и 0,5 мл бензальдегида. Смесь тщательно перемешивают в течение 5 минут и оставляют на 18—20 часов при температуре не выше +3°. За это время образуется пастообразная розовато-белая масса, конденсация сорбита с альдегидом заканчивается. К образовавшемуся продукту конденсации добавляют 5 мл охлажденной воды, содержимое стакана растирают палочкой и нейтрализуют добавлением 1,5 г безводного Na_2CO_3. Смесь перемешивают, оставляют на 1 час при температуре не выше 3°, затем содержимое стакана нагревают до кипения, кипятят в течение 1—2 минут, охлаждают струей холодной воды и фильтруют через взвешенный тигель Гуча или Шотта при слабом разрежении. Осадок на фильтре промывают водой и высушивают при 90—100° до постоянного веса.

Содержание сорбита в образце в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{b \cdot 100}{1,968 \cdot a},$$

где b — вес полученного дибензальдегида-сорбита в г;
1,968 — коэффициент пересчета веса осадка на сорбит;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПО МЕДНОМУ КОМПЛЕКСУ

Навеску вещества в количестве около 1 г помещают в мерную колбу емкостью 200 мл и растворяют в 15—20 мл воды. Колбу с содержимым помещают на водяную баню, нагретую до 30°, приливают 16 мл 15% раствора NaOH и затем при перемешивании постепенно добавляют 30 мл 10% раствора сернокислой меди. По мере того как медь потребляется на образование комплекса с сорбитом, раствор приобретает синий цвет, а избыточное количество меди образует со щелочью гидрат окиси меди, выпадающий в осадок. Как только прилито указанное количество раствора сернокислой меди, содержимое колбы доводят водой до метки и оставляют для осаждения гидрата окиси меди (приблизительно на 15—20 минут). Затем осторожно, не взмучивая осадка, пипеткой отбирают из колбы прозрачный раствор над осадком, фильтруют его, отбирают 25 мл фильтрата в коническую колбу с притертой пробкой емкостью 200—250 мл, подкисляют 25 мл 20% раствора H_2SO_4, приливают 20 мл 10% раствора KJ, быстро взбалтывают и выделившийся йод тотчас оттитровывают 0,1 н. раствором $Na_2S_2O_3$ в присутствии раствора крахмала до исчезновения синего окрашивания.

Содержание сорбита (а также маннита и глюкозы, если они присутствуют в испытуемом образце) в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0,0091 \cdot v_1 \cdot 100}{a \cdot v_2},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшее на титрование, в мл;
0,0091 — количество сорбита, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, в г;
v_1 — объем, до которого доведена навеска, в мл;
a — навеска в г;
v_2 — объем фильтрата, взятый на титрование, в мл;
100 — пересчет в %.

В отдельной навеске определяют методом Бертрана или Лейна и Эйнона процентное содержание глюкозы (если она присутствует) и количество ее (в процентах) вычитают из полученного в расчете значения. Разность приходится на содержание сорбита (и маннита) в процентах [1].

[1] В кристаллическом сорбите практически маннит и глюкоза не обнаруживаются. Эти определения имеют значение для технических растворов сорбита.

АНАЛИЗ СОРБИТА В РАСТВОРЕ

Определение сухих веществ

(методы разработаны Б И Идельсоном и А Д. Поспеевым на I Ленинградском витаминном заводе)

Определение сухих веществ в растворе сорбита производят при помощи рефрактометра. На рис. 29 изображен рефрактометр-сахариметр Киевского завода.

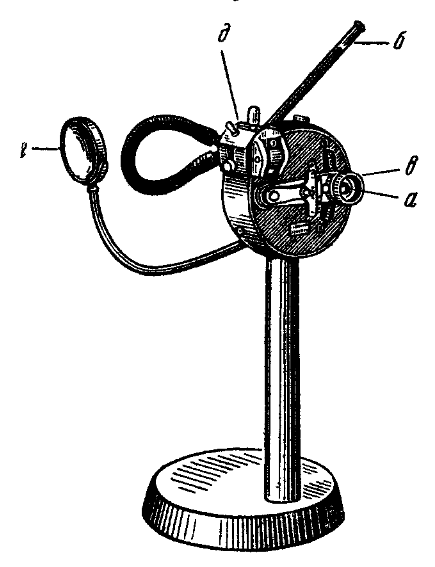


Рис 29 Рефрактометр-сахариметр Киевского завода

а — шкала (внутри окошка) *б* — термометр *в* — окуляр *г* — зеркало *д* — призмы

По полученным показаниям рефрактометра определяют содержание сухих веществ, пользуясь специальной таблицей (измерение производят при 20°)

Определение процентного содержания

Многие органические вещества обладают свойством отклонять плоско поляризованный луч света на величину, которая измеряется углом вращения. Определение угла вращения производится при помощи поляриметра (рис 30). В табл 8 приведены удельные вращения некоторых веществ

Отбирают пипеткой 50 мл испытуемого раствора сорбита в мерную колбу емкостью 100 мл, пипетку смывают водой в ту же колбу, добавляют 0,5 мл раствора азотнокислого свинца и 0,5 мл 5% раствора едкого натра

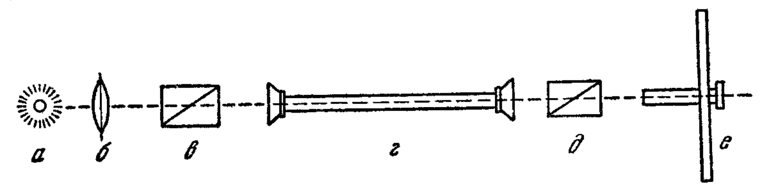


Рис 30 Схема поляриметра

а — источник света *б* — конденсатор *в* — неподвижный николь (поляризатор) *г* — испытуемый раствор *д* — подвижный николь (анализатор) *е* — окуляр и шкала

Таблица 8

Удельное вращение некоторых веществ

Наименование	$[\alpha]_D^{20}$
Сахароза	+66,5
Мальтоза	+135,5
Глюкоза	+52,8
Фруктоза	—93,3—97,17
Рафиноза	+104,5
Рамноза	+9,43
Маннит	—0,244
D сорбит	—1,7
L сорбоза	—43,65

Объем раствора в колбе доводят водой до метки и энергично встряхивают в течение 1 минуты. Смеси дают отстояться и фильтруют через воронку с широким горлом Прозрачным фильтратом заполняют поляриметрическую трубку длиной 2 дм, предварительно ополоснутую этим же раствором, и поляризуют.

Содержание сорбита в растворе в граммах на 100 мл (x) вычисляют по формуле:

$$x = 0{,}969 \cdot a - 0{,}32 \cdot P,$$

где P — показания поляриметра;
a — содержание сухих веществ в растворе в г на 100 мл;
0,969 и 0,32 — постоянные коэффициенты.

Примечание. Указанная формула приведена для поляриметра со шкалой Вентцке

Качественная реакция на глюкозу

В пробирку, содержащую 1—2 мл испытуемого раствора сорбита, приливают 2—3 капли раствора альфа-нафтола и по стенке пробирки осторожно 0,5 мл концентрированной H_2SO_4, избегая смешивания растворов. В присутствии глюкозы на границе жидкостей появляется фиолетовое, а при содержании около 0,1% глюкозы буреющее кольцо.

Определение содержания сорбита в растворе очищенного сорбита

Испытуемый раствор без разбавления и осветления фильтруют, фильтратом заполняют поляриметрическую трубку длиной 2 дм и поляризуют, как описано выше.

Содержание сорбита в пересчете на сухое вещество (x) вычисляют по формуле:

$$x = 96{,}9 - 32\frac{P}{a},$$

где 96,9 и 32 — постоянные коэффициенты.

Качественное испытание на присутствие никеля

(по прописи А. Д. Лебедева, лаборатория Йошкар-Олинского витаминного завода)

К 5 мл раствора сорбита добавляют 5—8 капель 10% раствора HNO_3, смесь нагревают до кипения; после охлаждения к ней добавляют 0,5 мл 10% раствора аммиака и 3—5 капель 1% спиртового раствора диметилглиоксима. При стоянии в течение 5 минут при отсутствии в растворе никеля не должно появиться розового окрашивания.

L-СОРБОЗА

```
              CH2OH
                |
   ┌────────────C — OH
   │            |
   O   HO — C — H
   │            |
   │     H — C — OH
   │            |
   │   HO — C — H
   │            |
   └────────────CH2
```

$C_6H_{12}O_6$
М. вес 180,16

Бесцветные кристаллы ромбической формы. Т. пл. 160—161°[1]. Обладает сладким вкусом; легко растворима в воде, очень трудно — в этиловом спирте и нерастворима в эфире. Восстанавливает раствор Фелинга уже на холоду.

ПОЛЯРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

(разработан Б. И. Идельсоном, Л. А. Петровой и Б. Б. Кантор в лаборатории I Ленинградского витаминного завода)

Точную навеску 19,8 г сорбозы растворяют в мерной колбе емкостью 100 мл в теплой воде (заполняя колбу на $^4/_5$ объема); после растворения навески содержимое колбы охлаждают до 20°, добавляют в колбу 1 мл раствора азотнокислого свинца и 1 мл раствора едкого натра (см. методы анализа сорбита).

Содержимое колбы доводят водой до метки и энергично взбалтывают в течение 1 минуты. Смеси дают отстояться, фильтруют через воронку с широким горлом, фильтратом заполняют поляриметрическую трубку дли-

---

[1] В литературе встречаются и другие данные (165°). См. Спутник химика. Т. 2. ОНТИ, 1935.

ной 2 дм, предварительно ополоснутую тем же фильтратом, и поляризуют вместе с заранее вложенной в ложе поляриметра кварцевой трубкой.

Содержание сорбозы в процентах в испытуемом образце (x) вычисляют по формуле:

$$x = (K - P) \cdot 2,$$

где K — величина угла вращения кварцевой трубки (постоянная);
P — показание поляриметра;
2 — коэффициент пересчета на нормальную навеску.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОРБОЗЫ В РАСТВОРАХ

(по прописи Б. И. Идельсона, Л. А. Петровой и Б. Б. Кантор, лаборатория I Ленинградского витаминного завода)

Отбирают пипеткой 50 мл испытуемого раствора в мерную колбу емкостью 100 мл, туда же добавляют по 1 мл растворов азотнокислого свинца и едкого натра, содержимое колбы доводят водой до метки, встряхивают, дают смеси отстояться, фильтруют и фильтрат поляризуют в трубке длиной 2 дм.

Содержание сорбозы в граммах на 100 мл раствора (x) вычисляют по формуле:

$$x = 0{,}396 \cdot (K - P) \cdot 2,$$

где 0,396 — коэффициент соответствия между 1° шкалы поляриметра и содержанием сорбозы в г на 100 мл;
K — величина угла вращения кварцевой трубки[1];

[1] Кварцевую трубку с известным углом вращения вправо применяют для расширения диапазона левой шкалы поляриметра с двойной компенсацией Величина угла вращения кварцевой трубки должна составлять не менее 30°.

P — показание поляриметра;
2 — разведение раствора.

Примечание. Указанная формула приведена для поляриметра со шкалой Вентцке

ДИАЦЕТОНСОРБОЗА

$C_{12}H_{19}O_6$
M вес 260

Диацетонсорбоза кристаллизуется из петролейного эфира в виде бесцветных пластинок с т. пл. 77—78°. Хорошо растворима в воде, спирте, серном эфире, труднее — в бензине и петролейном эфире; очень плохо растворима в хлороформе. В технической диацетонсорбозе может присутствовать моноацетонсорбоза. Она также хорошо растворима в воде и спирте, плохо растворяется в серном и совсем не растворяется в петролейном эфире. Ацетоновые группы у моноацетонсорбозы могут находиться в положениях 2 и 3 или 1 и 2; т. пл. этих соединений 93 и 143°.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАЦЕТОНСОРБОЗЫ ПО АЦЕТОНОВЫМ ГРУППАМ

(метод разработан в Научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте А. К. Руженцовой, Р. И. Крамаровой и Н. С. Горяиновой)

В основу метода положено отщепление кислотой ацетоновых групп и определение ацетона йодометрическим путем [Мессингер (Messinger, 1888, 1934, 1946)].

При этом протекают реакции в следующем направлении:

```
 ┌─────────────CH2OH
 │ H3C          |
 │  |  /O — C
 │  C<        |
 O  |  \O — C — H
 │ H3C          |
 │              C — O     CH3          H2SO4
 │              |    \   /            ──────→     2CH3COCH3
 └──────────────C — H   C
                |    /   \
              H2C — O     CH3
```

Освобождающийся ацетон определяется йодометрическим путем:

$$J_2 + 2KOH \rightarrow KJO + KJ + H_2O$$
$$CH_3COCH_3 + 6KJO \rightarrow CH_3COCJ_3 + 3KJ + 3KOH$$
$$CH_3COCJ_3 + KOH \rightarrow CH_3COOK + CHJ_3$$
$$6KJO + 6KJ + 12HCl \rightarrow 6J_2 + 12KCl + 6H_2O$$

Выделяющийся при подкислении свободный йод оттитровывается гипосульфитом натрия.

Анализ чистой диацетонсорбозы

Точную навеску не более 0,2 г диацетонсорбозы помещают в мерную колбу с притертой пробкой емкостью 100 мл, растворяют в 20 мл воды, прибавляют 25 мл 60% раствора H_2SO_4, колбу закрывают пробкой и оставляют на ночь при 20—25°. За это время от диацетонсорбозы количественно отщепляется ацетон. После этого содержимое колбы доводят до метки водой и тщательно перемешивают. Из полученного раствора переносят 10 мл в коническую колбу с притертой пробкой, туда же добавляют 25 мл воды, раствор нейтрализуют щелочью по фенолфталеину. К нейтральному раствору прибавляют 20 мл 0,1 н. раствора йода (из бюретки) и 15 мл нормального раствора NaOH (при помешивании). Колбу закрывают пробкой и оставляют точно на 4 минуты, после чего к содержимому колбы приливают 16 мл нормального раствора H_2SO_4 и выделившийся йод тотчас оттитровывают 0,1 н. раствором $Na_2S_2O_3$.

Одновременно ставят холостой опыт; из числа миллилитров гипосульфита, пошедшего на титрование холо-

стого опыта, вычитают число миллилитров гипосульфита, пошедшего на титрование испытуемой пробы. Разность соответствует числу миллилитров йода, вступившего в реакцию с ацетоном.

Содержание диацетонсорбозы в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0{,}000967 \cdot 2{,}2414 \cdot 1000}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора йода, вступившее в реакцию, в мл;
0,000967 — количество ацетона, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора йода, в г;
2,2414 — коэффициент пересчета на диацетонсорбозу;
1000 — постоянный коэффициент;
a — навеска в г.

Определение свободного ацетона в техническом продукте

Точную навеску около 0,2 г технической диацетонсорбозы помещают в коническую колбу с притертой пробкой емкостью 250—300 мл, прибавляют 40—50 мл воды, 20 мл 0,1 н. раствора йода (из бюретки), 15 мл нормального раствора NaOH, закрывают колбу пробкой и точно через 4 минуты добавляют 16 мл нормального раствора H_2SO_4 и выделившийся йод тотчас оттитровывают 0,1 н. раствором гипосульфита натрия. Параллельно ставят холостой опыт. Из числа миллилитров гипосульфита, пошедшего на титрование холостого опыта, вычитают число миллилитров гипосульфита, пошедшего на титрование испытуемой пробы. Разность соответствует числу миллилитров йода, вступившего в реакцию с ацетоном.

Содержание свободного ацетона в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0{,}000967 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора йода, вступившее в реакцию, в мл;
0,000967 — см. выше;
100 — пересчет в %;
a — навеска в г.

Определение моноацетонсорбозы в техническом продукте

Метод основан на извлечении диацетонсорбозы из смеси петролейным эфиром, в котором моноацетонсорбоза практически нерастворима, и дальнейшем определении в остатке моноацетонсорбозы по ацетоновым группам.

Точную навеску около 0,2 г технической диацетонсорбозы помещают во взвешенный вместе с палочкой стакан емкостью около 50 мл и экстрагируют диацетонсорбозу при нагревании на водяной бане (при 40—50°) отдельными порциями (по 5 мл) петролейного эфира при тщательном растирании стеклянной палочкой содержимого стакана. Эфирные вытяжки сливают. Извлечение петролейным эфиром производят до тех пор, пока капля эфирного экстракта перестанет оставлять на часовом стекле пятно по испарении эфира. Остаток в стакане сушат в вакууме и взвешивают. Затем остаток растворяют в мерной колбе емкостью 100 мл в 20 мл воды, прибавляют 25 мл 60% раствора H_2SO_4, колбу закрывают пробкой и оставляют на ночь. В дальнейшем поступают, как описано в методике определения диацетонсорбозы.

Процентное содержание ацетона (x_1) вычисляют по формуле.

$$x_1 - \frac{v\ 0,000967 \cdot 1000}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора йода, вступившее в реакцию, в мл;
0,000967 — см. выше;
a — навеска технической диацетонсорбозы в г;
1000 — постоянный коэффициент.

Содержание моноацетонсорбозы в технической диацетонсорбозе в процентах (x_2) вычисляют по формуле:

$$x_2 = 3,7931 \cdot x_1,$$

где 3,7931 — коэффициент пересчета на моноацетонсорбозу;
x_1 — содержание ацетона в пробе в %.

Определение общего количества ацетона

Определение производится, как описано ранее (см. анализ чистой диацетонсорбозы).

Общее количество ацетона в пробе в процентах (x_3) рассчитывают по формуле:

$$x_3 = \frac{v \cdot 0,000967 \cdot 1000}{a}$$

Обозначения см. выше.

Расчет процентного содержания диацетонсорбозы в испытуемом продукте (x_4) производят по формуле:

$$x_4 = x_3 - (x_1 + x) \cdot 2,2414$$

Обозначения см выше

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАЦЕТОНСОРБОЗЫ ПОЛЯРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

(разработан Б. И. Идельсоном и Л. А. Ростачевой в лаборатории I Ленинградского витаминного завода) [1]

Метод основан на извлечении диацетонсорбозы из технического продукта, содержащего моно- и диацетонсорбозу, хлороформом (в котором, по данным исследований авторов, моноацетонсорбоза не растворяется) с последующим поляриметрическим определением. Исходным положением при этом является то, что удельное вращение диацетонсорбозы в ацетоне при C=1,38 г в 100 мл составляет $[\alpha]_D^{18,5} = -18,1°$ [по данным Рейхштейна и Грюсснера (Reichstein, Grüssner, 1934)], а раствор диацетонсорбозы в хлороформе при C = 20 г в 100 мл и при 20°, при длине трубки в 1 дм составляет $[\alpha]_D^{20} = -6,3°$ (по данным Б. И. Идельсона и Л. А. Ростачевой).

Определение в кристаллическом продукте

Отвешивают на технохимических весах точно 27,5 г технической диацетонсорбозы (0,1 нормальной навески), растворяют в 10—12 мл воды (при нагревании) и возможно меньшим количеством воды переносят, без потерь, в узкогорлую колбу емкостью 200—250 мл. В колбу добавляют около 1 г активированного угля и по 25 мл растворов азотнокислого свинца и едкого натра (см. поляриметрический метод определения сорбозы). Содержимое колбы энергично взбалтывают в течение 1 мину-

[1] Л О Шнайдман, 1956

ты и после пятиминутного отстаивания фильтруют через двойной бумажный складчатый фильтр. Колбу и фильтр промывают небольшим количеством воды и промывную жидкость присоединяют к фильтрату. Фильтрат количественно переносят в делительную воронку, добавляют туда же хлороформ и экстрагируют диацетонсорбозу, повторяя экстракцию 4 раза, каждый раз с помощью 25 мл хлороформа.

Хлороформные экстракты соединяют, переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, объем раствора в колбе доводят хлороформом до метки. Поверх метки в колбу приливают дополнительно по 1 мл растворов азотнокислого свинца и щелочи. Содержимое колбы энергично встряхивают в течение 1 минуты и отстаивают в течение 5 минут.

Верхний водный слой из воронки сливают (при этом может быть слито некоторое количество хлороформного слоя, что не имеет значения), хлороформный слой быстро фильтруют и фильтратом заполняют поляриметрическую трубку длиной 2 дм. Трубку с раствором выдерживают в поляриметре 2 минуты и поляризуют (со включенным стеклянным светофильтром).

Содержание диацетонсорбозы в процентах в образце (x) вычисляют по формуле:

$$x = 10 \cdot P,$$

где P — показание поляриметра;
10 — постоянный коэффициент.

Определение в растворе

50 мл раствора диацетонсорбозы переносят в узкогорлую колбу емкостью 100 мл, добавляют около 0,5 г активированного угля и по 10 мл растворов азотнокислого свинца и щелочи. Далее поступают, как описано выше.

Содержание диацетонсорбозы в граммах на 100 мл раствора (x) вычисляют по формуле:

$$x = 2{,}75 \cdot P \cdot 2,$$

где P — показание поляриметра;
2 — пересчет на 100 мл;
2,75 — постоянный коэффициент.

Определение щелочности растворов диацетонсорбозы

Отбирают 10 мл испытуемого раствора в коническую колбу, добавляют около 50 мл воды и титруют нормальным раствором HCl в присутствии метилового красного до изменения окраски. Для сравнения перехода окраски рекомендуется рядом с титруемым раствором ставить холостой опыт с теми же количествами испытуемого раствора и воды в качестве «свидетеля».

Расчет щелочности раствора в граммах щелочи на 1 л (x) вычисляют по формуле:

$$x = v \cdot 0{,}056 \cdot 100,$$

где v — количество точного нормального раствора HCl, пошедшее на титрование, в мл;
0,056 — коэффициент пересчета на KOH;
100 — пересчет на л.

Контроль конца реакции окисления диацетонсорбозы

(метод предложен Б. И. Идельсоном, Л. П. Петровой и Б. Б. Кантор, лаборатория I Ленинградского витаминного завода)

Отбирают 100 мл реакционного раствора, добавляют 2—3 мл этилового спирта, раствор нагревают до обесцвечивания и фильтруют на бюхнеровской воронке. 50 мл фильтрата переносят в делительную воронку емкостью 200 мл и фильтрат дважды обрабатывают равным объемом хлороформа для извлечения диацетонсорбозы. Хлороформные экстракты собирают, фильтруют в заранее взвешенную на технохимических весах фарфоровую чашку, растворитель упаривают на водяной бане досуха (в вытяжном шкафу с хорошей вентиляцией), чашку с сухим остатком вновь взвешивают.

Расчет содержания остаточной диацетонсорбозы в граммах на 1 л (x) производят по формуле:

$$x = (g_1 - g_2) \cdot 20,$$

где g_1 — вес чашки с остатком диацетонсорбозы после выпаривания в г;
g_2 — вес пустой чашки в г;
20 — постоянный коэффициент.

Этот метод применим как контрольный в ходе технологического процесса окисления диацетонсорбозы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛАГИ В АЦЕТОНЕ КАРБИДНЫМ МЕТОДОМ

(разработан Л. А. Петровой и Н. Г. Шинкаревой в лаборатории I Ленинградского витаминного завода)

Метод основан на взаимодействии карбида кальция с водой. Реакция протекает по уравнению:

$$CaC_2 + 2H_2O = Ca(OH)_2 + C_2H_2.$$

Измерив объем выделяющегося ацетилена, можно рассчитать содержание воды в испытуемом образце.

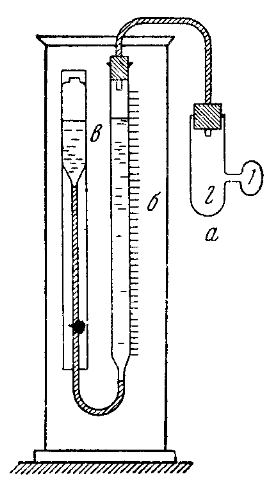


Рис 31 Прибор для определения воды карбидным методом.
а — реактор *2* с карманом *1*, *б* — бюретка на 25 мл, *в*—напорная груша

Для определения пользуются прибором, изображенным на рис. 31. В качестве рабочей жидкости употребляют насыщенный водный раствор поваренной соли (для удобства отсчета слегка подкрашенный метиленовой синей). Анализ производят следующим образом: поднимают грушу *в* и выравнивают уровни рабочей жидкости в бюретке и напорной груше вблизи нулевого деления. В отросток *1* реактора *а* насыпают из пробирки около 0,7 г тонко измельченного порошка карбида кальция. Пипеткой вводят в цилиндрический отросток *2* реактора *а* 1 мл испытуемого ацетона. Реактор *а* закрывают пробкой, соединенной каучуковой трубкой с бюреткой *б* и выдерживают в течение 6 минут (по песочным часам), а затем выравнивают уровни рабочей жидкости в бюретке и напорной груше и отсчитывают начальный объем V_1.

Опускают напорную грушу *в* в нижнее положение и с помощью деревянных щипцов (во избежание нагревания реактора руками) наклоняют реактор так, чтобы порошок карбида кальция высыпался в цилиндрический отросток, легким потряхиванием перемешивают ацетон с карбидом кальция, пока уровень жидкости в бюретке не перестанет изменяться.

Прибор оставляют в покое на 3 минуты (по песочным часам), затем, поднимая грушу, выравнивают уровни жидкости и отсчитывают по бюретке объем газовой смеси V_2. Объем выделившегося газа V находят по разности $V = V_2 - V_1$.

Содержание влаги в ацетоне в процентах (x) рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{100 \cdot 36 \cdot v}{1 \cdot 22\,400},$$

где 36 — г/мол $2H_2O$, участвующей в реакции;
22 400 — количество ацетилена, выделяемого 36 г/мол воды, в мл;
v — объем выделившегося газа в мл;
100 — пересчет в %.

При сокращении формула приобретает значение:

$$x = 0{,}16 \cdot v.$$

ДИАЦЕТОН-2-КЕТО-L-ГУЛОНОВАЯ КИСЛОТА

```
 ____________________ COOH·H2O
|                   \ |
|   H3C      O — C
|      \    /    |
O       C        |
|      /    \    |
|   H3C      O — C — H
|                |
|                C — O     CH3
|                |    \   /
|_______________ C—H   C
                 |    /   \
                CH2O       CH3
```

$C_{12}H_{17}O_6$
М. вес 274 (безв.)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

(по прописи А. К. Руженцовой, Р. И. Крамаровой и Н. С. Горяиновой, Научно-исследовательский химико-фармацевтический институт)

Навеску кислоты в количестве около 0,4 г растворяют в 10 мл 96% этилового спирта, прибавляют 20 мл воды и титруют 0,1 н. раствором NaOH в присутствии индикатора тимолфталеина до появления синего окрашивания.

Расчет процентного содержания 2-кето-L-гулоновой кислоты (x) производят по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0,0274 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование, в мл;
0,0274 — количество диацетон-2-кето-L-гулоновой кислоты (безводной), соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ ХЛОРИДОВ И СУЛЬФАТОВ В СЫРОЙ ДИАЦЕТОН-2-КЕТО-L-ГУЛОНОВОЙ КИСЛОТЕ

Около 1 г сырой диацетон-2-кето-L-гулоновой кислоты растворяют в небольшом количестве (15—25 мл) воды при нагревании, фильтруют. К 5 мл фильтрата добавляют 2—3 капли 10% раствора HNO_3 и 1—2 мл 1% раствора $AgNO_3$. Наличие мути или белого осадка указывает на присутствие хлоридов. К другим 5 мл фильтрата добавляют 1—2 мл 1% раствора $BaCl_2$. Появление мути или осадка указывает на присутствие сульфатов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В МАТОЧНИКАХ

(по прописи А. К. Руженцовой, Р. И. Крамаровой и Н. С. Горяиновой, Научно-исследовательский химико-фармацевтический институт)

10 мл маточника (после отделения диацетон-2-кето-L-гулоновой кислоты) титруют в присутствии фенолфталеина 0,1 н. раствором NaOH.

Следующие 10 мл маточника помещают в делительную воронку и экстрагируют несколько раз серным эфиром. По отделении от эфира водного слоя его титруют 0,1 н. раствором NaOH в присутствии фенолфталеина. Разность между первым и вторым титрованием соответствует находящейся в маточнике диацетон-2-кето-L-гулоновой кислоте.

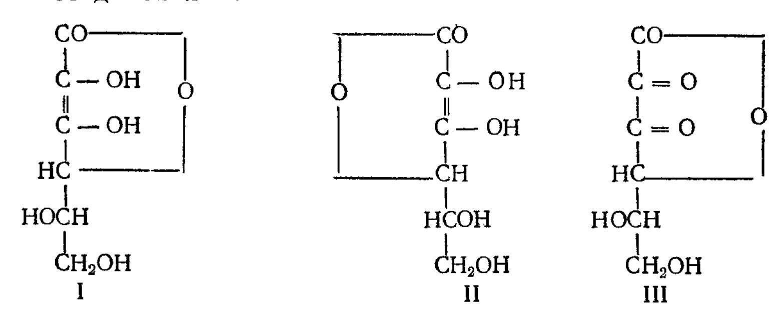
Расчет содержания диацетон-2-кето-L-гулоновой кислоты в граммах на 1 л маточника (x) производят по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0,0292 \cdot 1000}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на первое титрование, в мл;
v_1 — то же, пошедшее на второе титрование, в мл;
1000 — пересчет на л;
a — объем маточника, взятый на анализ, в мл;
0,0292 — количество диацетон-2-кето-L-гулоновой кислоты, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора NaOH, в г;

ВИТАМИН С (L-АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА)

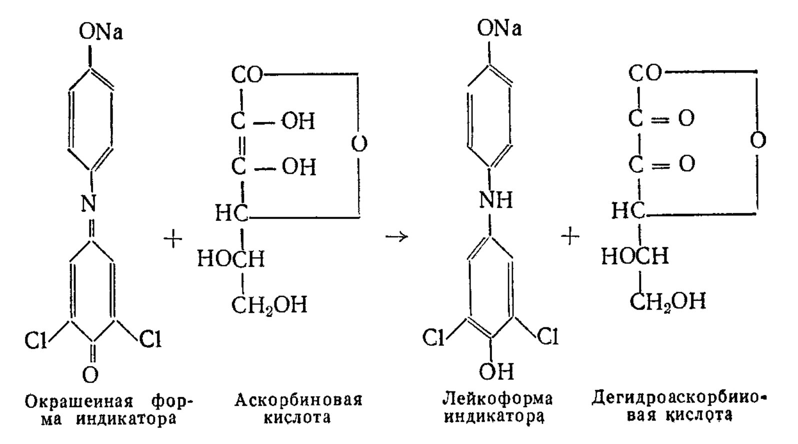
Аскорбиновая кислота в природе встречается в виде L-аскорбиновой кислоты (I), наиболее биологически активной формы витамина С, в виде D-аскорбиновой кислоты (II), не обладающей биологической активностью, и других биологически неактивных форм, в виде окисленной дегидроаскорбиновой кислоты (III), обладающей биологической активностью, поскольку эта форма легко восстанавливается в аскорбиновую кислоту, а также в виде связанной формы с белками, аскорбигена, и другими соединениями.



Промышленными препаратами витамина С являются L-аскорбиновая кислота синтетическая в кристаллическом виде, в драже, таблетках и растворах для инъекций в чистом виде, в смеси с глюкозой, с другими витаминами, а также препараты (сухие и жидкие концентраты, сиропы и настои) витамина С, получаемые из естественных источников (ложные плоды шиповника, плоды черной смородины, облепихи и др.).

Физико-химические свойства L-аскорбиновой кислоты

Показатель	Характеристика
Состояние вещества	Бесцветные кристаллы кислого вкуса, без запаха
Формула	$C_6H_8O_6$
Молекулярный вес	176,13
Температура плавления	190—193° (разл)
Растворимость	Легко растворяется в воде. Растворяется в метиловом и этиловом спирте. Не растворяется в эфире, бензоле, хлороформе, петролейном эфире
Оптическая активность	+ 24°(в воде); + 48° (в метаноле)
Абсорбционный максимум	265 mμ (в воде)
Окислительно-восстановительный потенциал	0,166 в. при 35° и pH=4,0
pH нормального раствора	2,2
Биологическая активность	1 ИЕ = 0,05 мг L-аскорбиновой кислоты



Окрашенная форма индикатора — Аскорбиновая кислота — Лейкоформа индикатора — Дегидроаскорбиновая кислота

L-аскорбиновой кислоте свойствен ряд окислительно-восстановительных реакций, которые обычно и используются в аналитических целях. При взаимодействии аскорбиновой кислоты с раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола аскорбиновая кислота восстанавливает (обесцвечивает) индикатор, сама же при этом окисляется (см. схему на стр. 230).

При взаимодействии аскорбиновой кислоты с йодноватокислым калием происходит аналогичная реакция окисления аскорбиновой кислоты:

$$2C_6H_8O_6 + KJO_3 + 2HCl \rightarrow 2C_6H_6O_6 + JCl + KCl + 3H_2O.$$

Эти реакции положены в основу описываемых ниже методов определения L-аскорбиновой кислоты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ПРОДУКТЕ

Йодатный метод

(по IX Госфармакопее СССР)

Около 0,5 г препарата (точная навеска) растворяют в воде в мерной колбе емкостью 50 мл, доводят до метки водой и перемешивают. Отбирают пипеткой 10 мл приготовленного раствора, к нему приливают 0,5 мл 1% раствора йодистого калия, 2 мл 0,5% раствора крахмала и 1 мл 2% раствора соляной кислоты и титруют 0,1 н. раствором йодноватокислого калия до появления стойкого слабо синего окрашивания.

Содержание аскорбиновой кислоты в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0,008806 \cdot v_1 \cdot 100}{a \cdot v_2},$$

где v — количество 0,1 н. раствора йодноватокислого калия, пошедшее на титрование, в мл;
a — навеска в г;
0,008806 — количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора KJO_3, в г;
v_1 — разведение в мл;
v_2 — количество раствора, взятое на титрование, в мл;
100 — пересчет в %.

Йодометрический метод

(по ГОСТ 4815-54)

Из полученного, как указано выше, раствора аскорбиновой кислоты отбирают 10 мл, приливают 2 мл 0,5% раствора крахмала и титруют 0,1 н. раствором йода до появления слабо синего стойкого окрашивания.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В АМПУЛИРОВАННЫХ РАСТВОРАХ

(по IX Госфармакопее СССР)

К 5 мл 5% раствора или 2,5 мл 10% раствора аскорбиновой кислоты приливают 10 мл воды и 0,2 мл 1% раствора формальдегида[1], перемешивают, прибавляют 2 мл 10% уксусной кислоты и титруют 0,1 н. раствором йода до появления неисчезающей синей окраски (индикатор — крахмал).

Содержание аскорбиновой кислоты в 1 мл раствора в граммах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0{,}008806}{a}.$$

Обозначения см. выше.

Примечание. Для определения сульфита отдельно оттитровывают 0,1 н. раствором йода 10 мл испытуемого раствора в присутствии крахмала. Разность между этим и описанным выше определением приходится на сульфит натрия.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПРЕПАРАТАХ

Железоаскорбиновая кислота

(по ВТУ-Ф № 1961/55)

0,3 г препарата (точная навеска) помещают в коническую колбу емкостью 200—250 мл, прибавляют 20 мл воды, растворяют навеску (при этом раствор окрашивается в темно-фиолетовый цвет), добавляют 5 мл ортофосфорной кислоты (уд. вес 1,7) и обесцветившийся раствор оттитровывают 0,1 н. раствором йода в присутствии крахмала до появления синего окрашивания.

[1] Для связывания сульфита натрия, прибавляемого к ампулированным растворам аскорбиновой кислоты, для их стабилизации.

Расчет процентного содержания аскорбиновой кислоты в препарате (x) производят по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0{,}008806 \cdot 100}{a},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора йода, пошедшее на титрование, в мл;
0,008806 — количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора йода, в г;
a — навеска в г;
100 — пересчет в %.

Определение аскорбиновой кислоты в таблетках и драже

(по IX Госфармакопее СССР)

Около 0,2 г (точная навеска) порошка растертых таблеток или драже взбалтывают с 10 мл воды и титруют 0,1 н. раствором йода в присутствии крахмала (индикатор) до появления неисчезающей синей окраски.

Содержание аскорбиновой кислоты в миллиграммах в 1 шт. драже или таблеток (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0{,}008806 \cdot d}{a},$$

где d — средний вес 1 шт. драже или таблеток в г;
0,008806 — количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора йода, в мг;
a и v — см. выше.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ И ДЕГИДРОАСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТ ПРИ ИХ СОВМЕСТНОМ ПРИСУТСТВИИ

Существует два способа определения обеих форм аскорбиновой кислоты: один из них заключается в том, что вначале в испытуемом растворе определяют содержание восстановленной аскорбиновой кислоты титрованием раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, йодноватокислым калием или йодом, а затем в параллельной пробе производят восстановление сероводородом дегидро-

аскорбиновой кислоты и после удаления из раствора избытка сероводорода оттитровывают тем же путем общее количество аскорбиновой кислоты. Из результатов второго титрования вычитают результаты первого титрования, разность соответствует содержанию дегидроаскорбиновой кислоты.

В объектах окрашенных, мутных, содержащих редуцирующие примеси, мешающие определению вещества, их удаляют с помощью раствора уксуснокислого свинца (растительные продукты) (В. А. Девятнин и В. М. Иосикова, 1935, 1936) или уксуснокислой ртути (животные ткани и органы) (В. М. Иосикова, 1939, 1940) с последующим восстановлением сероводородом. Эти методы подробно изложены в ГОСТ 7047-55 и других руководствах[1], поэтому нет необходимости подробно на них останавливаться.

Другие способы определения дигидро- и дегидроаскорбиновой кислот основаны на свойстве дегидроаскорбиновой кислоты давать окрашенные озазоны с динитрофенилгидразином, подобно другим соединениям, обладающим CO-группой. Основываясь на этой реакции Рое и Эстерлинг (Roe, Oesterling, 1944) разработали метод, позволяющий определять содержание аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот при их совместном присутствии колориметрическим путем. Для этого дигидроаскорбиновую кислоту предварительно превращают в дегидроаскорбиновую кислоту и после проведения реакции образования озазона сравнивают образующуюся окраску колориметрическим путем со стандартными растворами.

Реакция протекает в следующем направлении (В. А. Девятнин, 1948):

$$\begin{array}{l} CO \\ | \\ C-OH \\ \| \\ C-OH \\ | \\ HC \\ | \\ HOCH \\ | \\ CH_2OH \end{array} \; (-O-) \rightarrow \begin{array}{l} CO \\ | \\ C=O \\ | \\ C=O \\ | \\ HC \\ | \\ HOCH \\ | \\ CH_2OH \end{array} \; (-O-) + 2(H_2N\cdot NH-C_6H_3(NO_2)_2) \rightarrow$$

$$\rightarrow \begin{array}{l} (NO_2)_2C_6H_3-NH-N=C-CO \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\quad | \qquad\; | \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\quad | \qquad\; O \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\quad | \qquad\; | \\ (NO_2)_2C_6H_3-NH-N=C-HC \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad | \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\quad HO-CH \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad | \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad CH_2OH \end{array} + 2H_2O$$

[1] Методы определения витаминов. Пищепромиздат, 1954; Методическое руководство по определению витаминов. Медгиз, 1960.

Шварц и Вильямс (Schwartz, Williams, 1955) в недавнее время разработали очень простой способ, позволяющий избежать применения довольно сложной техники анализа. Этот метод был нами проверен и показал вполне удовлетворительные результаты. Ниже описывается метод Шварца и Вильямса в том виде, как он используется в нашей лаборатории.

Составление калибровочного графика. В серию пробирок вносят по 2 мл эталона-стандарта, содержащего 0, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 γ аскорбиновой кислоты, добавляют по 1 капле раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, по 2 мл раствора тиомочевины, по 1 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Все пробирки с содержимым помещают в термостат и оставляют на 3 часа при 37°. По прошествии указанного времени во все пробирки добавляют по 5 мл смеси — солянофосфатного реактива (общий объем смеси в каждой пробирке должен составлять 10 мл) и после тщательного перемешивания содержимого пробирок окраску растворов измеряют с помощью электрофотоколориметра со светофильтром $\lambda = 540$ mμ.

Полученные показания гальванометра пересчитывают на экстинкцию и откладывают на графике по оси ординат, а по абсциссе — соответствующие им количества аскорбиновой кислоты в гаммах.

Примечание. При пользовании колориметром типа Дюбоска с полученными растворами сравнивают окраску испытуемых растворов.

Метод определения. Подготавливают три пробирки (№ 1, 2 и 3).

В пробирку № 1 вносят 1 каплю раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола и 2 мл раствора тиомочевины.

В пробирки № 1, 2 и 3 вносят по 2 мл испытуемого раствора (содержащего не более 30 *мкг* аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот в 1 мл).

В пробирки № 2 и 3 добавляют по 1 капле раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола и по 2 мл раствора тиомочевины.

В пробирки № 1 и 2 вносят по 1 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина.

Пробирки с содержимым помещают в термостат и оставляют в нем при 37° на 3 часа. По истечении указанного времени к содержимому всех пробирок добавляют по 5 мл соляно-фосфатного реактива (общий объем смеси в каждой пробирке должен составлять 10 мл) и после тщательного перемешивания содержимого пробирок окраску растворов измеряют с помощью электрофотоколориметра со светофильтром $\lambda = 540$ mμ.

В пробирке № 1 определяют содержание дегидроаскорбиновой кислоты (общее количество), в пробирке № 2 — общее количество аскорбиновой кислоты. Пробирка № 3 служит контрольным опытом. Показания его вычитают из показаний для пробирок № 1 и 2.

Порядок работы и добавления реактивов проводятся по следующей схеме.

Пробирка № 1 (дегидроаскорбиновая кислота)	Пробирка № 2 (аскорбиновая кислота)	Пробирка № 3 (контроль)
1 капля индофенола	—	—
2 мл тиомочевины	—	—
2 мл испытуемого	2 мл испытуемого	2 мл испытуемого
—	1 капля индофенола	1 капля индофенола
—	2 мл тиомочевины	2 мл тиомочевины
1 мл фенилгидразина	1 мл фенилгидразина	—
Термостат 37°	Термостат 37°	Термостат 37°
5 мл $HCl + H_3PO_4$	5 мл $HCl + H_3PO_4$	5 мл $HCl + H_3PO_4$
—	—	1 мл фенилгидразина
Всего 10 мл	Всего 10 мл	Всего 10 мл

Примечание Раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола вносят для окисления аскорбиновой кислоты, раствор тиомочевины — для стабилизации аскорбиновой кислоты

Расчет содержания дегидроаскорбиновой кислоты (общее количество) в миллиграмм-процентах (x) производят по формуле:

$$x = \frac{c \cdot v \cdot 100}{a \cdot v_1 \cdot 1000},$$

где c — количество дегидроаскорбиновой кислоты, найденное по калибровочному графику, за вычетом из экстинкции испытуемого экстинкции контрольного опыта, в γ;
v — разведение в мл;
1000 — пересчет в г;
a — навеска в г;
v_1 — количество испытуемого раствора, взятое на определение, в мл;
100 — пересчет в %.

Расчет содержания аскорбиновой кислоты в образце в миллиграмм-процентах (x_1) производят по формуле:

$$x_1 = \frac{c\ v \cdot 100}{a \cdot v_1 \cdot 1000},$$

где c — количество аскорбиновой кислоты, найденное по калибровочному графику, за вычетом из экстинкции испытуемого экстинкции контрольного опыта, в γ.

Остальные обозначения см. выше.

Расчет содержания дегидроаскорбиновой кислоты в образце в миллиграмм-процентах (x_2) производят по формуле:

$$x_2 = x - x_1.$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПРЕПАРАТАХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Согласно ГОСТ 7047-55[1], определение витамина С может быть проведено не только свинцово-сероводородным (арбитражным), но и упрощенным методом в следующих растительных продуктах и препаратах: шиповник, свежеприготовленные настои, сиропы, порошок, сухие и жидкие концентраты, пюре из плодов шиповника, свежие плоды и овощи и другие свежие растительные продукты, растительные консервы, свежеотжатые

[1] Текст ГОСТ 7047-55 по разделу «Витамин С» был подготовлен специальной комиссией, выделенной Методбюро при ВСНИТО в составе В. А. Девятнина, В М Иосиковой, С М Немец, К Л Поволоцкой, В М Селивановой и Н С Ярусовой

томатный, мандариновый и апельсиновый соки. Не допускается анализировать свежие растительные продукты упрощенным методом, если они содержат большое количество дубильных веществ.

Упрощенный (индофенольный) метод определения витамина С

(по ГОСТ 7047-55)

Навеску жидких продуктов и продуктов густой консистенции разводят 2% раствором соляной кислоты в мерной колбе емкостью 50 или 100 мл до объема. Получают так называемый первоначальный раствор.

Рекомендуемая величина навесок:	
драже, таблетки, порошок и концентраты шиповника	1—2 г
сироп из плодов шиповника	5 г
соки и экстракты	1—50 мл
плоды шиповника очищенные, пюре шиповника с сахаром	5 г
плоды шиповника целые и сульфитированные продукты	10 г
свежие плоды, ягоды, фрукты, зелень	10—50 г
консервы	5—50 г

Первоначальный раствор для настоев хвои, соков и прочих продуктов с содержанием не выше 20 мг%' витамина С получают путем разведения без применения мерных колб. В этом случае кислоту в зависимости от содержания витамина С берут к весу навески в отношении 1 : 1 или больше.

Навеску твердых продуктов тщательно растирают, применяя в случае надобности 5—10 г стеклянного порошка, и приливают постепенно 2% раствор HCl в кратном к навеске отношении (не менее 3 мл на 1 г навески). При использовании в анализе мерной посуды стеклянный порошок не употребляют. После растирания смесь оставляют в ступке настаиваться в течение 10 минут.

После настаивания таких продуктов, как драже, таблетки или порошок шиповника, содержимое ступки количественно переносят в мерную колбу емкостью 50—100 мл и отмеренную для настаивания кислоту расходуют не полностью· часть кислоты оставляют для промывки ступки и пестика и доведения жидкости в колбе до метки. Допускается непосредственный перенос навесок хорошо растворяющихся драже и таблеток в мерную колбу для растворения в ней и настаивания.

Перед переносом в центрифужные стаканы содержимое колбы хорошо перемешивают.

При экстракции прочих твердых продуктов 2% раствор соляной кислоты наливают в ступку строго по расчету выбранной кратности к навеске. По окончании настаивания жидкость из ступки вместе с нерастворившейся частью разливают по центрифужным стаканам.

Содержимое центрифужных стаканов центрифугируют до просветления.

При отсутствии центрифуги центрифугирование заменяют фильтрованием через гигроскопическую вату или сложенную в несколько слоев марлю.

После центрифугирования жидкость из центрифужных стаканов сливают в один сосуд, перемешивают и получают так называемый первоначальный экстракт.

При применении фильтрования содержимое ступки после настаивания тщательно перемешивают и отфильтровывают не всю жидкость, а только некоторую ее часть в таком количестве, чтобы в случае надобности возможно было многократное повторение анализа первоначального экстракта.

При анализе сухих плодов шиповника навеску измельченных плодов количественно переносят в ступку с заранее внесенным туда стеклянным порошком (около 5 г); осторожно, тщательно и возможно мельче растирают, подливая небольшими порциями 150 мл дистиллированной воды комнатной температуры и настаивают 10 минут. Из полученной взвеси после тщательного размешивания центрифугируют или фильтруют некоторую часть через слой ваты, вложенной в воронку.

В зависимости от содержания витамина С отбирают пипеткой от 1 до 5 мл центрифугата или фильтрата и переносят в колбу емкостью 50—100 мл, куда заранее внесено 1 мл 2% раствора HCl, затем приливают столько воды, чтобы общий объем содержимого колбы составлял 15 мл, и титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола из микробюретки, слегка взбалтывая до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение $^1/_2$—1 минуты. В случае титрования слабого витамино-

носителя раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола прибавляют по каплям; при титровании сильного витаминоносителя вначале приливают по нескольку капель раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола сразу. По окончании титрования после записи отсчета по бюретке дополнительно приливают две контрольные капли раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, и если они дадут интенсивное розовое окрашивание, то это указывает, что конец титрования определен правильно.

Примечание. При отсутствии микробюретки допускается применение при титровании градуированной на 0,01 мл пипетки.

В случае окрашенности центрифугата или фильтрата, мешающей уловить появление розового окрашивания, а также при высоком содержании витамина С центрифугаты или фильтраты разводят перед титрованием водой вдвое или более [1].

Примечание. В случае анализа незрелых плодов шиповника вместо воды для экстракции применяют 2% соляную кислоту.

При каждом анализе проводят не менее двух параллельных определений (с двумя навесками), причем повторные титрационные числа в каждом определении не должны разниться между собой более чем на 0,03 мл. Из них берут среднее арифметическое. Титрование должно продолжаться не более 2 минут, а количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшее на одно титрование, должно быть в пределах 1—2 мл. Результаты параллельных определений (из двух навесок) не должны отличаться друг от друга более чем на $\pm 5\%$.

Для каждого анализа делают поправку на реактивы (контрольный опыт). В коническую колбу наливают 1 мл 2% HCl и такое количество воды, чтобы получился объем, который имелся при титровании испытуемого объекта. Затем прибавляют из микробюретки по каплям раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола до первого появления розовой окраски. Количество израсходованного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола в миллилитрах является поправкой на реактивы. Поправка обычно составляет для титруемого объекта (15 мл) 0,04—0,06 мл

[1] Окрашенные объекты можно титровать с применением хлороформа или другого органического растворителя; при встряхивании с ним избыток индофенола окрашивает растворитель.

и вычитается из объема раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование экстракта. При увеличении титруемого объекта до 20—30 мл производят соответствующее определение поправки.

Содержание аскорбиновой кислоты в миллиграммпроцентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v_1 \cdot F \cdot v_2 \cdot 0,08806 \cdot 100}{a \cdot v_3},$$

где v_1 — количество рабочего раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшее на титрование, за вычетом поправки на реактивы, в мл;

F — поправка на титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола для перевода на точно 0,001 н. раствор;

v_2 — объем, до которого доведена навеска при прибавлении к ней экстрагирующей жидкости, в мл;

v_3 — объем анализируемой жидкости, взятой для титрования, в мл;

a — навеска в г или объем в мл;

0,08806 — количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл точно 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, в мг;

100 — пересчет в %.

Упрощенный (йодатный) метод определения витамина С

(по ГОСТ 7047-55)

Экстракцию витамина С проводят 2% HCl, как указано выше.

При работе с объектами твердой или густой консистенции из центрифугата или фильтрата солянокислых экстрактов отбирают 1—5 мл (в зависимости от содержания витамина С), вносят в коническую колбу емкостью 50—100 мл, куда заранее налито 0,5 мл 1% раствора йодистого калия, 2 мл 0,5% раствора крахмала и столько воды, чтобы общий объем жидкости составил 10 мл. Содержимое колбы титруют из микробюретки 0,001 н. раствором йодноватокислого калия до появления стойкого слабо синего окрашивания.

Жидкие пробы разводят непосредственно перед титрованием соляной кислотой или водой или титруют без разведения. В последнем случае титруют в присутствии 1 мл 2% соляной кислоты.

Поправка на реактивы (контрольный опыт) производится следующим образом: в коническую колбу наливают 0,5 мл 1% раствора йодистого калия, 2 мл 0,5% раствора крахмала, 1 мл 2% HCl и столько воды, чтобы общий объем жидкости составил 10 мл, и титруют из микробюретки 0,001 н. раствором KJO_3 до появления слабо синего окрашивания [1].

Содержание витамина C в миллиграмм-процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v_1 \cdot 0{,}08806 \cdot 100 \cdot F \cdot v_2}{a \cdot v_3},$$

где v_1 — количество 0,001 н. раствора KJO_3, пошедшее на титрование, за вычетом поправки на реактивы, в мл.

Остальные обозначения см. выше.

Примечание. Определение витамина C йодатным упрощенным методом, согласно ГОСТ 7047-55, в жидких концентратах из плодов шиповника, витаминизированных конфетах, консервированных соках, свежеотжатых окрашенных соках, растительных консервах, свежих плодах, овощах и ягодах, сушеных продуктах, сульфитированных овощах, витаминизированном чае не применяется.

Упрощенный метод определения витамина C в сульфитированных продуктах [2]

(разработан В. А. Девятниным и Е. В. Грунт, ВНИВИ)

Навеску сульфитированного продукта тщательно измельчают в ступке со стеклянным порошком или кварцевым песком и 2% раствором HCl, взятым в 25-кратном количестве по отношению к навеске. Полученную вытяжку количественно переносят в колбу, снабженную пробкой с двумя отверстиями; через одно из них проходит опущенная в жидкость трубка, соединенная с источником азота или углекислоты. На стенке колбы делают отметку, соответствующую объему жидкости в колбе; через систему пропускают ток инертного газа и одновременно нагревают содержимое колбы до кипения, время от времени взбалтывая.

По прошествии 3—5 минут кипячения из колбы отбирают пробу жидкости для определения в ней наличия SO_2. В случае положительной реакции кипячение продолжают несколько минут и вновь пробу жидкости испытывают на SO_2.

Проба на SO_2: исследуемую кислую вытяжку нейтрализуют по лакмусу 10% раствором KOH или NaOH. На фарфоровую пластинку или крышку от тигля помещают 5 капель нейтрализованной жидкости и прибавляют 1 каплю водного раствора малахитовой зеленой (концентрация 1 : 2000). В присутствии SO_2 голубая окраска смеси быстро исчезает.

В случае отсутствия в пробе SO_2 систему разъединяют, содержимое колбы охлаждают струей воды, вытяжку в колбе приводят 2% раствором HCl к исходному объему и в дальнейшем определяют витамин C, как описано выше (там же см. расчет результатов анализа).

---

[1] Допускается применение при титровании 0,01 н. раствора KJO_3.

[2] В плодах шиповника и других некрахмалистых и малобелковых объектах. Определение можно также проводить с помощью свинцово-сероводородного метода, так как, по данным Института витаминологии Министерства здравоохранения СССР, сернистая кислота полностью выводится из вытяжки в виде $PbSO_4$ (Методическое руководство по определению витаминов. Медгиз, 1960). Свинцово-сероводородный метод изложен в ГОСТ 7047-55, а также см. Методы определения витаминов. Пищепромиздат, 1954.

Методы контроля в производстве витамина D

ЭРГОСТЕРИН

Эргостерин при облучении ультрафиолетовыми лучами превращается в витамин D_2 и является, следовательно, провитамином D_2. В значительном количестве содержится в дрожжах, мицелии пенициллиум и других продуктах, используемых в качестве сырья в витаминной промышленности.

Эргостерин имеет следующее строение:

Эргостерин в отличие от витамина D осаждается дигитонином, сапонином растения Digitalis (sp) (наперстянка), образуя нерастворимое молекулярное соединение (1 : 1) — дигитонид-эргостерин[1]. С уксусным ангид-

[1] Дигитонин $C_{56}H_{92}O_{29}$; т пл. 235°; $[\alpha]_D^{20}$ —54° (этанол).

ридом и серной кислотой образует окрашенный комплекс. Однако эта реакция, ранее использовавшаяся для количественного определения эргостерина, не является

Физико-химические свойства эргостерина

Показатель	Характеристика
Состояние вещества	Бесцветные игольчатые кристаллы Из этанола кристаллизуется с 1 молекулой воды
Формула	$C_{28}H_{44}O$ (безв.)
Молекулярный вес	396,66 (безв.)
Температура плавления	166°
Растворимость	Нерастворим в воде; растворяется в оргаинческих растворителях
Оптическая активность	$[\alpha]_D^{20}$ — 132° (2% раствор в $CHCl_3$)
Максимум абсорбции	260, 270, 280 и 293 mμ (в этаноле)
Флуоресценция	Серо-голубая

достаточно специфичной. В основу существующих методов определения эргостерина положена реакция осаждения его дигитонином как более избирательная.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭРГОСТЕРИНА В ДРОЖЖАХ И МИЦЕЛИИ ГРИБОВ

(по данным I Московского витаминного завода)[1]

К навеске испытуемого продукта (дрожжи, мицелий) в количестве 1 г, взятой на аналитических весах, добавляют 30 мл 40% водного раствора KOH, 30 мл 96% этилового спирта и омыляют в течение $2^1/_2$ часов в колбе с обратным холодильником на кипящей водяной бане.

[1] Разработан на I Московском витаминном заводе

По окончании омыления содержимое колбы охлаждают, количественно переносят в делительную воронку, смывая водой; добавляют 30 мл воды и 15 мл 96% этилового спирта и взбалтывают. К содержимому воронки добавляют серный эфир в количестве 50 мл, осторожно (во избежание образования эмульсии) перемешивают, эфирный слой сливают. Извлечение неомыляемых повторяют еще 5 раз с порциями по 25 мл серного эфира. Эфирные экстракты соединяют, тщательно промывают водой до нейтральной реакции (по фенолфталеину), после отделения воды сушат в течение 20—30 минут свежепрокаленным сернокислым натрием.

Эфирный экстракт фильтруют, фильтр и сернокислый натрий на нем промывают эфиром, эфир отгоняют на водяной бане в токе азота или углекислоты досуха.

Остаток в колбе растворяют в 5 мл 96% этилового спирта, спиртовой раствор нагревают почти до кипения и к нему добавляют по каплям при помешивании 5 мл горячего 1% раствора дигитонина в 96% этиловом спирте[1].

Для полноты выделения осадка раствор оставляют в темноте на 18—24 часа, после чего осадок количественно переносят на высушенный до постоянного веса и взвешенный фильтр. Осадок на фильтре промывают 50 мл 96% этилового спирта и затем 25 мл серного эфира.

После испарения эфира фильтр с осадком высушивают при 90—95° до постоянного веса и взвешивают.

Содержание эргостерина в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{A \cdot 100}{4,034 \cdot a},$$

где A — вес осадка после высушивания в г;
a — навеска в г;
4,034 — постоянный коэффициент;
100 — пересчет в %.

[1] Для более полного и быстрого осаждения стеринов рекомендуется добавить к смеси несколько капель дистиллированной воды.

АНАЛИЗ ЭРГОСТЕРИНА

(по ВТУ 416-52 МПП СССР)

Определение летучих примесей

В тарированный бюкс помещают навеску эргостерина в количестве 0,5 г, взятую на аналитических весах. Бюкс с навеской помещают в вакуум-сушильный шкаф и выдерживают при 45—50° в течение 2 часов при разрежении не менее 600 мм ртутного столба. По окончании сушки бюкс с навеской охлаждают в эксикаторе над хлористым кальцием и взвешивают. Если изменение в весе не превышает 2%, сушку можно считать законченной; если изменение в весе превысит 2%, высушивание продолжают еще в течение 1 часа, после чего бюкс с навеской вновь взвешивают.

Содержание летучих веществ в процентах (x) рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{(a - b) \cdot 100}{a},$$

где a — вес вещества до высушивания в г;
b — вес вещества после высушивания в г;
100 — пересчет в %.

Определение температуры плавления

Это определение проводится в запаянном капилляре или в токе CO_2[1].

Определение процентного содержания

Точную навеску испытуемого образца эргостерина в количестве около 0,01 г переносят с помощью 20 мл 96% этилового спирта в стакан и нагревают на водяной бане до полного растворения навески. В другой стакан наливают 5 мл 1% спиртового раствора дигитонина.

Содержимое обоих стаканов доводят на водяной бане до кипения и горячий раствор дигитонина приливают

[1] Определение т. пл. в токе CO_2 и прибор для этой цели описаны в сб.: Методы определения витаминов. Под ред. В. А. Девятнина. Пищепромиздат, 1954.

к горячему испытуемому раствору. Кипение поддерживают 2—3 минуты. Затем стакан покрывают часовым стеклом и ставят в холодную воду для охлаждения. Для полноты выделения осадка стакан с ним оставляют в темноте на 18—24 часа, после чего выпавший осадок дигитонид-эргостерина количественно отфильтровывают через высушенный и взвешенный фильтр. Можно для этих целей использовать стеклянный фильтр № 5 или 4, предварительно высушенный и взвешенный.

Остаток на фильтре промывают вначале 50 мл 96% этилового спирта, а затем 25 мл серного эфира.

После испарения эфира фильтр с осадком высушивают в сушильном шкафу при 90—95° до постоянного веса и взвешивают.

Содержание эргостерина в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{A \cdot 100}{4{,}034 \cdot a}.$$

Обозначения см. выше.

ВИТАМИН D

Витамин D образуется путем облучения стеринов ультрафиолетовым светом. Известно несколько витаминов D, которые различаются между собой лишь строением боковой цепи в зависимости от того, из какого провитамина D они образованы:

Витамин D	Провитамин D
Витамин D_2, эргокальциферол	Эргостерин
Витамин D_3, холекальциферол	7-дегидро-холестерин
Витамин D_4	22-дигидро-эргостерин
Витамин D_5	7-дегидро-ситостерин

Биологическая активность витаминов D также различна. Наиболее биологически активными являются витамины D_2 и D_3[1].

[1] Из моллюсков Mediolus demissus выделены стерины, дающие при облучении витамин D. Т. пл. 128°. Биологическая активность = 2/3 активности витамина D_3 (для крыс и цыплят). Спектр поглощения сходен с таковым для витамина D_2.

Физико-химические свойства витамина D

Показатель	Характеристика	
	витамин D_2	витамин D_3
Состояние вещества	Бесцветный кристаллический порошок	
Формула	$C_{28}H_{44}O$	$C_{27}H_{44}O$
Молекулярный вес	396,66	384,65
Температура плавления	115—117°	82—83°
Растворимость	В воде нерастворим Растворим в органических растворителях	
Удельное вращение	+103 (этанол) +82,6 (ацетон)	+83,3 (ацетон)
Биологическая активность	1 ИЕ = 0,025 γ	1 ИЕ = 0,025 γ
Максимум абсорбции	265 mμ ($E^{1\%}_{1\,см}$ = 460—485) в абсолютном алкоголе	265 mμ ($E^{1\%}_{1\,см}$ = 450—490) в абсолютном алкоголе
для продуктов фотолиза:		
люмистерин	265, 280 mμ	
тахистерин	268, 280, 294 mμ	
токсистерин	248 mμ	

Превращение эргостерина в витамин D_2 имеет ступенчатый характер: в процессе фотолиза образуется ряд промежуточных продуктов, имеющих поглощение в ультрафиолете в области 250—300 mμ (рис. 32).

В последние годы эта схема подверглась пересмотру; предполагают, что превращение эргостерина идет так: эргостерин — провитамин D_2 — витамин D_2 — тахистерин — люмистерин — провитамин D_2.

Промышленными препаратами витамина D являются масляные концентраты, получаемые путем облучения спиртовых растворов эргостерина с последующим переводом продуктов облучения в масле и удалением спирта; спиртовые концентраты, получаемые путем облучения спиртовых растворов эргостерина и последующего сгущения в вакууме до требуемой концентрации: масляные

HO

Эргостерин. Т. пл. 166°
$[\alpha]_D^{20}$ —132°($CHCl_3$)

↓

HO

Люмистерин. Т. пл. 118°
$[\alpha]_D^{20}$ +192° (ацетон)

↓

HO

Протахистерин

↓

HO

Тахистерин $[\alpha]_D^{20}$ —70° (бензол)

↓

HO Витамин D_2

Токсистерин
Макс. λ = 248 mμ
Супрастерин I
Т. пл. 104°
$[\alpha]_D^{20}$ —76°($CHCl_3$)
максим. глуб. в ультрафиолете
Супрастерин II. Т. пл. 110°
$[\alpha]_D^{20}$ + 63°($CHCl_3$)
максим. глуб. в ультрафиолете

и спиртовые концентраты, получаемые растворением в масле или спирте кристаллического витамина D_2, эргокальциферола; масляные растворы кристаллического витамина D_3, драже и таблетки, содержащие витамин D, а также облученные дрожжи, служащие для кормовых целей.

Витамины D_2, D_3 и др. дают в присутствии ацетилхлорида розовато-желтое окрашивание с хлороформным раствором треххлористой сурьмы. Механизм реакции недостаточно изучен; по-видимому, он аналогичен реакции треххлористой сурьмы с витамином А. Это свойство и положено в основу всех существующих методов определения витаминов D. Чапке и Плессинг (Pschapke, Plessing, 1957) рекомендована новая реакция витамина D с $SnCl_2$.

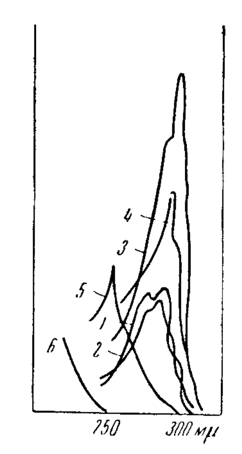


Рис. 32. Абсорбционные кривые продуктов фотолиза эргостерина (по Виндаусу).

1 — эргостерин;
2 — алюмистерин;
3 — тахистерин;
4 — витамин D_2;
5 — токсистерин;
6 — супрастерин.

Основным затруднением при определении витамина D является наличие в масляных и спиртовых препаратах облученного эргостерина фотодериватов, которые дают аналогичную реакцию.

В естественных продуктах этому определению также мешают стерины, кетон 250, витамин А и каротин. Ценные исследования проведены И. Н. Гаркиной и В. Н. Букиным (1957), которые использовали для разработки количественного метода определения витамина D метод хроматографии на бумаге, описанный ранее Брухманом (Bruchmann, 1951), Чапке и Плессингом (1955), Мак Магоном (Mac Mahon, 1950) и другими авторами.

Метод, предложенный И. Н. Гаркиной и В. Н. Букиным для хроматографического определения витамина D, был положен в основу разработанного в нашей лаборатории И. А. Солуниной способа определения витаминов D_2 и D_3, отделения от интерферирующих веществ и количественного анализа промышленных препаратов и пищевых продуктов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА D В ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

Подготовка к определению

Спиртовые концентраты витамина D (облученный эргостерин) разводят 96% этиловым спиртом с таким расчетом, чтобы в 1 мл полученного раствора содержалось около 40 000 ИЕ витамина D_2.

Масляные концентраты витамина D_2 (облученный эргостерин) обрабатывают по методике, описанной ниже (стр. 255). Неомыляемую фракцию растворяют в 1 мл 96% этилового спирта с расчетом получения 40 000 ИЕ витамина D_2 в 1 мл раствора.

Сухие препараты, содержащие масляный раствор витамина D, подвергают экстрагированию эфиром; после удаления растворителя остаток омыляют, как описано ниже.

«Свидетель» витамина D_2 — 20 мг кристаллического эргокальциферола (точная навеска) растворяют в абсолютном этиловом спирте в мерной колбе емкостью 25 мл. Содержание витамина D_2 в 1 мл составляет 32 000 ИЕ.

Хроматография

Хроматографическую бумагу (ленинградская, плотностью 85) нарезают вдоль листа на полосы размером 15 × 35 см и обрабатывают 20% раствором муравьиной кислоты или 10% раствором HCl в течение 15—20 часов. Бумагу промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод на лакмус. Отмытую бумагу подсушивают при комнатной температуре. В эмалированную кювету наливают 5—10% водный раствор $Al_2(SO_4)_3$ и пропитывают бумагу протягиванием листов через указанный раствор. Бумагу подвешивают и дают возможность стечь излишнему раствору сернокислого алюминия. Затем бумагу обрабатывают, как описано, 2 н. раствором аммиака и промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод. Отмытую бумагу сушат при комнатной температуре.

На обработанную раствором сернокислого алюминия бумагу наносят микропипеткой в несколько приемов

по две одинаковые пробы испытуемого раствора и «свидетеля» витамина D_2 в количестве 0,025—0,03 мл на расстоянии 3 см друг от друга и 5—7 см от нижнего края листа бумаги. Нанесенные пятна должны иметь диаметр не более 0,5 см. Содержание витамина D в конечном объеме должно составлять около 1000 ИЕ (для испытуемого) и 640—800 ИЕ (для «свидетеля»). После высыхания нанесенных растворов бумагу помещают в хроматографическую камеру, насыщенную парами растворителя, состоящего из смеси петролейного эфира (температура кипения 50—70°) и ацетона (6% к петролейному эфиру). При восходящей хроматограмме бумагу помещают нижним концом в растворитель на 1—2 м, при нисходящей — в лодочку, в которую затем наливают растворитель. Для лучшего насыщения камеры парами растворителя на дно ее наливают небольшое количество растворителя.

Процесс хроматографирования при 20—22° длится $1^1/_2$—2 часа, после чего хроматограмму удаляют из камеры и быстро высушивают на воздухе. Высушенную хроматограмму разрезают вдоль листа на 4 равные полоски.

Отбирают 2 полоски, на которых нанесены испытуемый раствор и «свидетель» витамина D, и проявляют горячим хлороформным раствором треххлористой сурьмы (50 г $SbCl_3$ в 50 мл хлороформа), быстрым протягиванием полос через налитый в чашку Петри горячий раствор. Проявленные пятна витамина D и фотодериватов очерчивают карандашом, по проявленным пятнам отмечают расположение пятен на непроявленных полосах и вырезают пятна витамина D с некоторым запасом по длине к верхнему и нижнему концу. Из нижнего конца хроматограммы (отступив на 2—3 см от точки нанесения пятен) вырезают полоску бумаги, по величине соответствующую вырезанным пятнам, которая служит в качестве контроля на бумагу.

Экстракция

Вырезанные пятна витамина D и контроля мелко нарезают и помещают в конические колбы с притертыми пробками; в каждую колбу наливают по 1 мл хлороформа и оставляют на 20—30 минут.

Колориметрирование

По истечении 20—30 минут в колбах проводят реакции витамина D с раствором треххлористой сурьмы в хлороформе, прибавляя для этого в колбы по 6 мл раствора треххлористой сурьмы и 3 капли уксусного ангидрида. Точно через 4 минуты после добавления последнего реактива измеряют интенсивность образовавшейся окраски со светофильтром 480—530 mμ.

В качестве контроля для установки прибора на нуль используют хлороформ.

При расчете величину экстинкции для контрольной бумаги вычитают из величины экстинкции для бумаги с пятнами витамина D. Расчет содержания витамина D проводят по калибровочному графику, составленному по чистому эргокальциферолу, с учетом объема испытуемого раствора, взятого на анализ [1].

Содержание витамина D в 1 мл испытуемого концентрата в ИЕ (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{c \cdot v}{v_1 \cdot v_2},$$

где c — содержание витамина D в 1 мл раствора, найденное по калибровочному графику, в ИЕ;
v — объем спирта, взятый для предварительного разведения спиртового концентрата, в мл;
v_1 — количество спиртового концентрата, взятое для разведения, в мл;
v_2 — объем разбавленного концентрата, нанесенный на хроматограмму, в мл.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА D В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ЭРГОКАЛЬЦИФЕРОЛЕ

Точную навеску кристаллического эргокальциферола в количестве 0,04 г растворяют в этаноле в мерной колбе емкостью 100 мл и доводят этанолом до метки. Полученный раствор разводят этанолом с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора содержалось около 400 ИЕ витамина D. На реакцию берут 1 мл хлороформного раствора, измеряют оптическую плотность раствора при 265 mμ.

Содержание витамина D_2 в препарате в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{D \cdot v \cdot v_2}{a \cdot v_1 \cdot 465},$$

где D — содержание витамина D в 1 мл раствора в ИЕ;
a — навеска в г;
v, v_1 и v_2 — разведения в мл;
465 — постоянный коэффициент.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА D

(разработано В. А. Девятниным и И. А. Солуниной, химико-аналитическая лаборатория ВНИВИ)

К навеске испытуемого образца, взятой из расчета содержания в ней 200—300 ИЕ витамина D, добавляют двойной объем 20% спиртового раствора KOH и омыляют на водяной бане при температуре кипения спирта с обратным холодильником в течение не менее 2 часов. По окончании омыления содержимое колбы количественно переносят в делительную воронку двумя объемами воды, неомыляемую фракцию 6 раз экстрагируют серным эфиром, каждый раз порциями по 40—50 мл. Эфирные экстракты соединяют, промывают водой до нейтральной реакции по фенолфталеину и после отделения водно-спиртового слоя просушивают безводным сернокислым натрием.

Из экстракта эфир отгоняют в токе азота или CO_2 досуха. Сухой остаток растворяют в 5—8 мл 96% этилового спирта, стерины из раствора вымораживают на холоду или удаляют их осаждением 1% спиртовым раствором дигитонина и отфильтровывают.

Примечание. Если требуется определить содержание стеринов, осадок растворяют в небольшом количестве бензола и наносят на хроматографическую бумагу, как описано выше.

[1] Хроматографирование «свидетеля» с известной концентрацией дает возможность установить процент потерь (или возврата) витамина D при хроматографировании и внести соответствующую поправку на содержание витамина D в испытуемом растворе.

Для снижения потерь витамина D при хроматографировании желательно испытуемые растворы наносить на бумагу в токе CO_2, при этом возврат витамина D достигает до 90%.

Из фильтрата упаривают растворитель досуха в вакууме, остаток растворяют в небольшом количестве петролейного эфира и пропускают через адсорбционную колонку, заполненную свежепрокаленной окисью алюминия (высота слоя адсорбента 10—12 см, диаметр колонки 10 мм).

Витамин D элюируют с колонки при помощи 25—35 мл петролейного эфира. Из элюата отгоняют растворитель в вакууме, сухой остаток растворяют в 1 мл хлороформа и проводят колориметрическое определение, как описано выше.

В случае применения хроматографического метода определения сухой остаток растворяют в 1 мл 96% этилового спирта и далее поступают, как описано выше.

Составление калибровочного графика. Для составления калибровочного графика применяют раствор чистого кристаллического эргокальциферола в хлороформе, содержащий 10 000 ИЕ витамина D_2 в 10 мл (1 ИЕ витамина D_2 соответствует 0,025 γ чистого эргокальциферола). Хлороформный раствор витамина D хранится не более 1 дня.

Измерение интенсивности окраски хлороформного раствора кристаллического эргокальциферола с треххлористой сурьмой проводят в электрофотоколориметре со светофильтром 480—530 mμ.

Для приведения электрофотоколориметра к нулю пользуются чистым хлороформом. Для получения калибровочного графика берут 1,0; 0,75; 0,5 и 0,25 мл стандартного раствора витамина D_2, доводят хлороформом до объема 1 мл, добавляют по 3 капли уксусного ангидрида и по 6 мл раствора треххлористой сурьмы (отношение испытуемого раствора к раствору треххлористой сурьмы должно составлять 1 : 6). Общий объем реакционной смеси должен составлять 7 мл.

Точно через 4 минуты после добавления последнего реактива измеряют получаемые окраски, и величины экстинкции откладывают на графике по оси ординат, а соответствующие концентрации витамина — по оси абсцисс.

В пределах содержания витамина D от 200 до 1000 ИЕ в 1 мл на графике получается прямая линия.

Удобно пользоваться для целей сравнения стандартным раствором эргокальциферола.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА D_2 АДСОРБЦИОННЫМ МЕТОДОМ

Чапке и Плессинг (1955, 1958) рекомендовали для отделения витамина D_2 от фотодериватов испытуемую вытяжку взбалтывать с активированным тальком. На этой основе в химико-аналитической лаборатории В. А. Девятниным, И. А. Солуниной и Л. А. Кузнецовой (1962) был разработан количественный метод.

Подготовка образца к анализу. 1 мл испытуемого спиртового раствора, содержащего около 200 000 ИЕ витамина D_2, помещают в колбу Вюрца и отгоняют в вакууме спирт при слабом нагревании на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в хлороформе, переносят в мерную колбу емкостью 25 мл и доводят хлороформом до метки.

При анализе масляных препаратов витамина D вначале препарат омыляют, неомыляемую фракцию растворяют в хлороформе и далее поступают, как описано выше.

Отделение фотодериватов. 1—1,5 мл полученного хлороформного раствора пропускают при слабом разрежении через адсорбционную колонку с активированным тальком, предварительно смоченную хлороформом (высота слоя адсорбента 10 см; поверх его помещают слоем 0,5 см безводный сульфат натрия; диаметр колонки 0,8 см, скорость пропускания 30—40 капель в минуту). Элюцию витамина D с адсорбента производят при помощи 10 мл хлороформа (в несколько приемов). Элюат переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, приемник несколько раз споласкивают хлороформом, который сливают в ту же колбу, объем раствора доводят до метки хлороформом.

Колориметрирование. Из полученного раствора отбирают пипеткой 1 мл в кювету фотоколориметра и проводят реакцию с раствором треххлористой сурьмы, как описано выше.

Содержание витамина D_2 в 1 мл препарата в ИЕ (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{c \cdot 25 \cdot 25}{v_1 \cdot v_2},$$

где c — найденное по калибровочному графику содержание витамина D_2 в ИЕ;

25 — первое разведение в мл;

25 — второе разведение в мл;

v_1 — количество испытуемого раствора, взятое для первого разведения, в мл;

v_2 — количество раствора, взятое на адсорбцию, в мл.

Методы контроля в производстве витамина E

Под общим названием витамина E известен ряд соединений, обладающих E-витаминными свойствами: α-токоферол, β-токоферол, γ-токоферол, δ-токоферол и другие токоферолы [1].

Структурная форма токоферолов следующая:

α-токоферол

β-токоферол

γ-токоферол

δ-токоферол

---

[1] Недавно выделенный ζ-токоферол находится в оливковом масле, которое содержит до 72% этой формы токоферола [Буниан, Грин, Мамелис, Мацинкевич (Bunyan, Green, Mamelis, Macinkewitz, 1957)].

ε-токоферол ζ-токоферол η-токоферол

$$R = CH_2 - CH_2 - CH_2 - \underset{}{\overset{CH_3}{\overset{|}{C}H}} - CH_2 - CH_2 - CH_2 - \overset{CH_3}{\overset{|}{C}H} - CH_2 - CH_2 - CH_2 - \underset{CH_3}{\underset{|}{\overset{CH_3}{\overset{|}{C}H}}}$$

Наибольшей Е-витаминной активностью отличается α-токоферол; β-, γ- и δ-токоферолы менее активны. Токоферолы обладают также антиокислительными свойствами: их антиокислительная активность противоположна их Е-витаминной активности:

dα-токоферол,	биологическая	активность	в	процентах	100
dlα-токоферол	»	»	»	»	67
dβ-токоферол	»	»	»	»	33
dlβ-токоферол	»	»	»	»	16
dγ-токоферол	»	»	»	»	1
dlγ-токоферол	»	»	»	»	меньше 1
dδ-токоферол	»	»	»	»	меньше 1
ε-токоферол	»	»	»	»	около 20
ζ-токоферол	»	»	»	»	50

Промышленными препаратами витамина Е являются синтетический α-токоферол-ацетат, препараты, получаемые из естественного сырья, концентраты из пшеничных зародышей, получаемые путем экстракции, и концентраты из богатых токоферолом масел, получаемые методом молекулярной дистилляции.

Химические методы определения витамина Е основаны на образовании окрашенных хинонов при окислении молекулы токоферола:

α-токоферол → α-токоферол—хинон

Физико-химические свойства токоферола

Показатель	Характеристика			
	α-токоферол	β-токоферол	γ-токоферол	δ-токоферол
Внешний вид	Маслянистая жидкость			
Брутто-формула	$C_{29}H_{50}O_2$	$C_{28}H_{48}O_2$	$C_{28}H_{48}O_2$	$C_{27}H_{46}O_2$
Молекулярный вес	430	416	416	402
Температура плавления аллофаната	161—162°	138—139°	136—138°	41—42° для п-фенил-азобензоата
Растворимость	Растворяется в органических растворителях и жире В воде нерастворим			
Биологическая активность	1 ИЕ= 1 мг	—	—	—
Максимум абсорбции $E^{1\%}_{1\,см}$ (в этаноле)	294 mμ= 77,0—88,0[1]	285,8mμ= 86,0	298 mμ= 92,8	298 mμ=92,8
Удельное вращение $[\alpha]^{20}_D$	1,503—1,505			

[1] $E^{1\%}_{1\,см}$ для dlα-токоферол-ацетата при $\lambda = 285$ mμ = 42—45 [Кноблох (Knobloch)].

Окисление может производиться HNO_3, $AgNO_3$, $FeCl_3$, $AuCl_3$, $Ce_2(SO_4)_3$ и т. д. Так, токоферолы, окисляясь хлорным железом, восстанавливают его до хлористого; количество же хлористого железа определяется интенсивностью окраски раствора при добавлении ортофенантролина или α-α′-дипиридила, который дает с двухвалентным железом комплексный ион:

С помощью химических методов удается разделить и отдельно определить содержание α-токоферола и суммы β-, γ-, δ- и других токоферолов. Это представляет интерес, так как позволяет судить одновременно о Е-витаминной активности и антиокислительной ценности испытуемого продукта. Метод раздельного определения α-токоферола и других форм токоферола основан на том, что β-, γ-, δ- и другие формы токоферолов способны с солями азотистой кислоты давать желтоокрашенные нитрозопроизводные, тогда как α-токоферол в реакцию нитрозирования не вступает. Эта цветная реакция, описанная Скуди и Бушем (Scudi, Buhs, 1942), в дальнейшем послужила основой метода определения этих токоферолов в смеси с α-токоферолом, предложенного Стерном и Бакстер (Stern, Baxter, 1947). Сочетая метод определения суммы токоферолов с методом нитрозирования, нам удалось, разработать доступный метод раздельного определения α- и других токоферолов.

Более детальное разделение токоферолов может быть достигнуто с помощью хроматографических или полярографических методов. Такой метод был предложен Кноблохом (1955). В. И. Колтуновой (1958) в нашей лаборатории удалось значительно его упростить и модифицировать, в связи с чем этот метод может быть рекомендован для исследовательских целей.

Абсорбциометрические методы, основанные на измерении максимума поглощения на соответствующей длине волны в ультрафиолете, применимы лишь к индивидуальным синтетическим токоферолам, а в применении к смесям дают зачастую искаженные результаты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКОФЕРОЛОВ В МАСЛАХ, МАСЛЯНЫХ РАСТВОРАХ ТОКОФЕРОЛ-АЦЕТАТА И КОНЦЕНТРАТАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ ЭКСТРАКЦИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИСТИЛЛЯЦИИ[1]

(разработано В. А. Девятниным и И. А. Солуниной во ВНИВИ)

Определение суммы токоферолов

Точную навеску масла в количестве 2—3 г или концентрата в количестве 1—2 г или 10—30% масляного раствора синтетического токоферолацетата в количестве 0,1—0,3 г помещают в колбу, куда приливают 10—15 мл 10% спиртового раствора КОН и омыляют на водяной бане при 80—85° с обратным холодильником в течение 30—45 минут в присутствии 50—60 мг пирогаллола. По окончании омыления содержимое колбы количественно переносят в делительную воронку двойным объемом воды, неомыляемую фракцию четырежды экстрагируют серным эфиром, каждый раз порциями по 35—40 мл. Эфирные экстракты собирают, промывают в делительной воронке дистиллированной водой до нейтральной реакции по фенолфталеину. После отделения воды сушат свежепрокаленным сернокислым натрием. Высушенный эфирный экстракт сливают в колбу, растворитель отгоняют в токе углекислоты или азота досуха. Остаток неомыляемых веществ растворяют в несколько приемов в 10—15 мл бензола, переносят в мерную колбу емкостью 25 мл и доводят объем до метки бензолом. Из полученного раствора отбирают пипеткой 8—10 мл раствора и пропускают через адсорбционную колонку с диатомитом[2] (высота слоя диатомита 3,5 см, диаметр 15 мм) при слабом разрежении. Токоферолы с адсорбента смывают 12—15 мл бензола, после чего весь элюат количественно переносят в мерную колбу емкостью 25 мл и доводят объ-

---

[1] При определении токоферолов в растениях и пищевых продуктах необходимо получить из испытуемого продукта жировую фракцию (экстракцией в аппарате Сокслета или другим путем). Пользуются также способом омыления навески.

[2] Или силикагелем. При анализе растительных продуктов и масел, содержащих каротин, применяют диатомит, который задерживает пигменты; при анализе промышленных препаратов — силикагель, задерживающий посторонние примеси.

ем до метки бензолом (основной раствор). Из полученного раствора отбирают пипеткой 1—2 мл в колбу емкостью 25 мл, приливают 10—20 мл бензола, затем добавляют 1 мл раствора ортофенантролина[1] или 0,5% раствора α-α′-дипиридила, хорошо перемешивают и приливают 1 мл раствора хлорного железа по каплям при перемешивании содержимого колбы; объем раствора быстро доводят бензолом до метки, перемешивают и оставляют в темноте точно на 10 минут. По истечении 10 минут измеряют окраску раствора со светофильтром 490 mμ, устанавливая нулевое показание прибора по чистому бензолу. Параллельно ставят контроль на реактивы, взятые в тех же количествах, что и в опыте. Показания экстинкции для контрольного опыта вычитают из показания экстинкции для испытуемого раствора. Содержание суммы токоферолов определяют по графику, составленному по чистому α-токоферолу. Содержание токоферолов в миллиграмм-процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{C \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{a \cdot v \cdot v_1},$$

где C — найденное по калибровочному графику содержание токоферолов в мг;
25 — первое разведение в мл;
25 — второе разведение в мл;
100 — пересчет в %;
a — навеска в г;
v — количество основного раствора, взятое на адсорбционную колонку, в мл;
v_1 — количество испытуемого раствора, взятое для проведения реакции, в мл.

Составление калибровочного графика. Точную навеску 50 мг чистого α-токоферола растворяют в бензоле в мерной колбе емкостью 250 мл. Для получения точек калибровочного графика из полученного раствора отбирают пипеткой последовательно 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мл раствора для получения 5 точек калибровочного графика

[1] Ортофенантролин $C_{12}H_8N_2$ позволяет открывать ионы железа (двухвалентного) в концентрации 1 : 1 000 000.

и проводят реакцию в мерных колбах емкостью 25 мл с $FeCl_3$ и ортофенантролином или α-α′-дипиридилом, как указано выше. Получаемые окраски измеряют на электрофотоколориметре со светофильтром 490 mμ и величины экстинкций по показаниям прибора откладывают на графике по оси ординат, а соответствующие концентрации α-токоферола в миллиграммах—на оси абсцисс. Для приведения прибора к нулю пользуются чистым бензолом.

Определение β-, γ-, δ- и других нитрозирующихся токоферолов

Основной раствор (см. технику метода определения суммы токоферолов) после отбора из него 1—2 мл для определения суммы токоферолов, как указано выше, выпаривают в вакууме досуха, сухой остаток растворяют в 8—10 мл абсолютного спирта, который отмеривают пипеткой. Из полученного раствора отбирают пипеткой 1—2 мл и помещают в делительную воронку емкостью 50 мл, туда же добавляют при перемешивании точно 0,2 мл ледяной уксусной кислоты и точно 3 мл 2% раствора нитрита натрия из быстро освобождающейся пипетки. Смесь интенсивно перемешивают в течение 5 секунд и оставляют стоять точно 60 секунд, а затем добавляют 2 мл 20% раствора KOH, перемешивают, добавляют 10 мл дистиллированной воды, 0,7—1 г безводного сернокислого натрия и точно 12 мл петролейного эфира. Смесь интенсивно перемешивают в течение 30 секунд, дают отстояться; слой петролейного эфира, окрашенный в желтый цвет, переносят в кювету электрофотоколориметра и колориметрируют со светофильтром 400 mμ, устанавливая нулевое показание прибора по чистому петролейному эфиру.

Параллельно ставят контроль: для этой цели берут такое же количество основного раствора, что и для опыта, приливают 10 мл дистиллированной воды, прибавляют 0,7—1 г безводного сернокислого натрия и 12 мл петролейного эфира, смесь интенсивно перемешивают в течение 30 секунд и после отстаивания слой петролейного эфира колориметрируют, как указано выше. Экстинкцию для контрольного опыта вычитают из экстинкции испытуемого. Расчет содержания нитрозирующихся токоферо-

лов производят по калибровочному графику, составленному по γ-токоферолу.

Содержание нитрозирующихся токоферолов в миллиграмм-процентах (y) вычисляют по формуле:

$$y = \frac{C \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{a \cdot v_1 \cdot v_2},$$

где C — найденное по калибровочному графику содержание иитрозирующихся токоферолов, за вычетом контроля в мг;
25 — первое разведение в мл;
25 — второе разведение в мл;
100 — пересчет в %;
a — навеска в г;
v_1 — количество испытуемого раствора, взятое на определение нитрозирующихся токоферолов, в мл;
v_2 — количество основного бензольного раствора, взятое на отгонку в вакууме, в мл.

Составление калибровочного графика. Точную навеску концентрата γ-токоферола после определения в нем процентного содержания γ-токоферола на спектофотометре или хроматографическим методом растворяют в абсолютном спирте в мерной колбе из расчета содержания 0,4—0,5 мг γ-токоферола в 1 мл стандартного раствора. Для получения точек калибровочного графика из полученного стандартного раствора последовательно отбирают пипеткой 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 и 1,2 мл стандартного раствора и проводят реакцию нитрозирования, как указано выше. Получаемые окраски измеряют на электрофотоколориметре со светофильтром 400 mμ, и величины экстинкций по показаниям прибора откладывают на графике по оси ординат, а соответствующие концентрации витамина в миллиграммах — на оси абсцисс. Для приведения прибора к нулю пользуются чистым петролейным эфиром.

Содержание α-токоферола в испытуемом образце в миллиграмм-процентах (Z) производят расчетным путем по формуле:

$$Z = x - y,$$

где x — содержание суммы токоферолов (α+β+γ+δ) в мг%;
y — содержание нитрозирующихся токоферолов (β+γ+δ) в мг%.

Примечание. Пересчет процентного содержания α-токоферола к общему содержанию витаминов группы Е (в процентах) производят по формуле·

$$Z_1 = \frac{z \cdot 100}{x}.$$

ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКОФЕРОЛОВ В МАСЛАХ И ЖИРАХ

(разработан В. А. Девятниным и В. И. Колтуновой, химико-аналитическая лаборатория ВНИВИ)

Точную навеску испытуемого продукта в количестве 3—5 г подвергают омылению с помощью 25 мл 2 н. раствора KOH в течение 30 минут на кипящей водяной бане в присутствии 50—60 мл пирогаллола. К содержимому колбы добавляют 25 мл воды и неомыляемую фракцию извлекают в делительной воронке 3—4 раза серным эфиром. Эфирные экстракты промывают водой, высушивают сернокислым натрием, фильтруют, а растворитель удаляют (более подробно технику омыления см выше).

Неомыляемый остаток растворяют в 96% этиловом спирте, а содержащиеся стерины осаждают 1% спиртовым раствором дигитонина. После полного осаждения стеринов смесь фильтруют, к фильтрату добавляют 5 мл 0,1 н. спиртового раствора комплексной соли аммоний-нитрата церия и взбалтывают. Через 10 минут окисленные продукты извлекают в делительной воронке серным эфиром, эфирный раствор промывают водой, высушивают сернокислым натрием и фильтруют. Из фильтрата удаляют растворитель отгонкой в вакууме.

Полученный остаток растворяют в абсолютном этиловом спирте. К аликвоту спиртового раствора, содержащего не менее 2 мг токоферилхинонов, добавляют 10 мл ацетатного буфера, содержащего 75% этилового спирта (pH=7,0). Раствор после пропускания через него азота подвергают электролизу в ячейке полярографа.

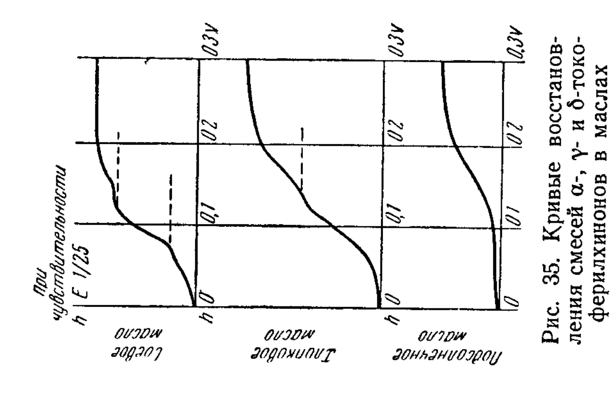


Рис. 35. Кривые восстановления смесей α-, γ- и δ-токоферилхинонов в маслах

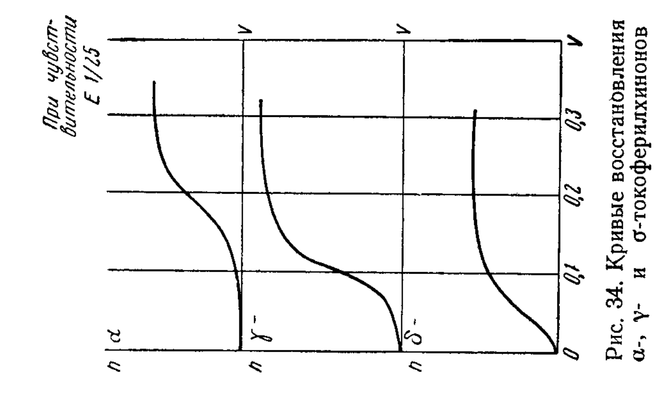


Рис. 34. Кривые восстановления α-, γ- и σ-токоферилхинонов

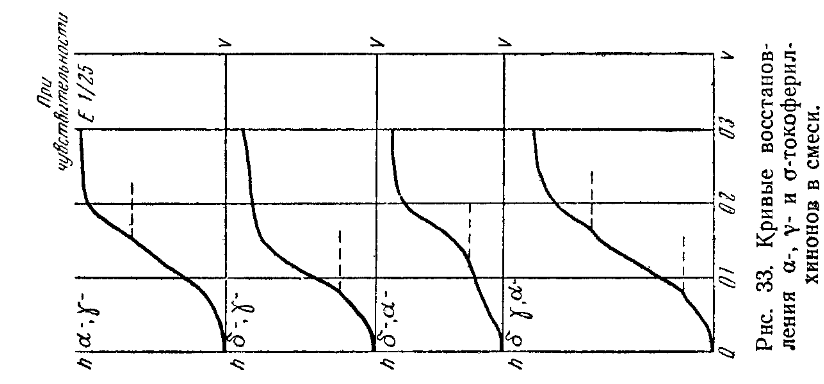


Рис. 33. Кривые восстановления α-, γ- и σ-токоферилхинонов в смеси.

Расчет содержания токоферолов производят по калибровочному графику, составленному по чистому α-токоферолу.

Содержание отдельных форм токоферолов в миллиграмм-процентах вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v \cdot c \cdot 100}{a \cdot v_1},$$

где x — содержание α-, β-, γ-, δ-токоферолов в мг%;
v — объем спирта, взятый для растворения неомыляемой фракции, в мл;
c — количество токоферилхинонов, найденное по калибровочному графику, в мг;
a — навеска в г;
v_1 — объем спиртового раствора токоферилхинонов, взятый на полярографирование, в мл;
100 — пересчет в мг%.

Характер кривых восстановления токоферилхинонов синтетических и в естественных продуктах представлен на рис. 33, 34 и 35.

Методы контроля в производстве витамина К

2-МЕТИЛ-1, 4-НАФТОХИНОН (МЕТИНОН)

$C_{11}H_8O_2$
М. вес 172,19

Кристаллический порошок лимонно-желтого цвета с очень слабым характерным запахом. Практически нерастворим в воде, растворим в ацетоне, бензоле, хлороформе, этиловом спирте и растительных маслах. Неустойчив к действию света и на свету легко разлагается. Т. пл. 105—107°. Разлагается в щелочной среде, с бисульфитом натрия дает бисульфитное производное, легко растворимое в воде. При попадании на кожу и слизистые оболочки вызывает сильное раздражение. Ввиду того что его антигеморрагическая активность намного выше естественного витамина K_1, он применяется в терапевтической практике как вещество, в известной мере заменяющее витамин К, способствующее нормальному свертыванию крови, и неправильно называется некоторыми авторами витамином K_3, поскольку 2-метил-1,4-нафтохинон в живой клетке в свободном виде не обнаружен.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

(разработано М. П. Захаровой и В. А. Девятниным во ВНИВИ)

В основу метода положена реакция хинонов с HJ, описанная еще в конце прошлого столетия Валюром (Valeur, 1899). Хиноны при воздействии на них йодистоводородной кислоты легко восстанавливаются до гидрохинонов; освобождающийся при этом йод количественно определяется гипосульфитом натрия. Реакция протекает следующим образом:

$$+ 2HJ \rightarrow \quad + J_2$$

Аналогичным образом реакция протекает и с метиноном:

$$+ 2HJ \rightarrow \quad + J_2$$

Это позволяет по количеству выделившегося при реакции йода судить о количестве 2-метил-1,4-нафтохинона.

Техника метода. Навеску испытуемого препарата, содержащую не более 150 мг метинона, помещают в коническую колбу с притертой пробкой и растворяют в небольшом количестве 96% этилового спирта [1]. Отдельно смешивают при охлаждении льдом 20 мл концентрированной HCl (уд. вес 1,19) с равным объемом 96% этилового спирта. К хорошо охлажденной смеси добавляют

[1] При определении метинона в драже и таблетках навеску испытуемого продукта тщательно растирают в ступке со спиртом, извлекая спиртом весь метинон; раствор фильтруют, колбу и фильтр промывают спиртом, спиртовый раствор используют для анализа.

20 мл 10% водного раствора KJ, смесь быстро оттитровывают 0,1 н. раствором гипосульфита до обесцвечивания и немедленно приливают к испытуемому раствору. Выделившийся в свободном состоянии йод тотчас оттитровывают 0,1 н. раствором гипосульфита натрия.

Содержание метинона в испытуемом препарате в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 8,6 \cdot 100}{a \cdot 1000},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшее на титрование, в мл;
8,6 — количество метинона, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, в мг,
a — навеска в г;
100 — пересчет в %;
1000 — пересчет в г.

При сокращении формула приобретает значение:

$$x = \frac{v \cdot 0,86}{a}.$$

ВИКАСОЛ

(бисульфитное производное 2-метил-1,4-нафтохинона)

$\cdot NaHSO_3 \cdot 3H_2O$ $C_{11}H_9O_5SNa \cdot 3H_2O$

М. вес 330,3

Бесцветный мелкокристаллический порошок горького вкуса, легко растворим в воде, не растворяется в органических растворителях. Имеет значительное преимущество перед 2-метил-1,4-нафтохиноном, так как обладает хорошей растворимостью в воде и лишен его токсических свойств.

Бисульфитное производное (викасол) содержит:

1 часть	2-метил-1,4-нафтохинона,	м. вес	172,19
1 »	бисульфита натрия	» »	104,06
3 части	воды	» »	54,02

Таким образом, это соединение с молекулярным весом 330,3 содержит 52,1% органической части молекулы, 16,4% воды и 31,5% неорганической части.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ

Йодометрический метод

(разработан М. П. Захаровой и В. А. Девятниным во ВНИВИ)

В основу метода положен способ йодометрического определения 2-метил-1,4-нафтохинона, описанный при анализе 2-метил-1,4-нафтохинона. Предварительно бисульфитное соединение осторожно разлагают щелочью, выпадающий осадок метинона далее поступает на определение.

Техника метода. Навеску препарата, содержащую не более 500 мг викасола, или навеску растертой средней пробы таблеток, содержащую не более 0,5 г викасола, растворяют в 100 мл воды и если нужно при анализе таблеток, фильтруют. К раствору добавляют осторожно, по каплям, 1% раствор щелочи (KOH или NaOH) до полноты осаждения метинона. Осадок отфильтровывают через небольшой гладкий фильтр, на фильтре промывают 2—3 раза сильно охлажденной (на льду) водой и затем растворяют в 96% этиловом спирте. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу емкостью 50 мл, фильтр несколько раз промывают спиртом, сливая его в ту же колбу. Объем раствора в колбе доводят спиртом до метки. Из полученного раствора отбирают по 10 мл в конические колбы или склянки с притертыми пробками и оттитровывают метинон.

Для этого отдельно смешивают при сильном охлаждении льдом 20 мл концентрированной HCl (уд. вес 1,19) с равным объемом 96% этилового спирта. К смеси добавляют 20 мл 10% водного раствора KJ, смесь быстро оттитровывают 0,1 н. раствором гипосульфита натрия до обесцвечивания и немедленно выливают в колбу или склянку с испытуемым раствором. Выделяющийся в свободном состоянии йод тотчас оттитровывают 0,1 н. раствором гипосульфита натрия [1].

[1] Крахмал не применяют

Содержание викасола в испытуемом препарате в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{v \cdot 0{,}0165 \cdot v_1 \cdot 100}{a \cdot v_2},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшее на титрование, в мл;
0,0165 — количество викасола, соответствующее 1 мл точного 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, в г;
v_1 — объем спиртового раствора метинона в мл;
100 — пересчет в %;
a — навеска в г;
v_2 — объем спиртового раствора метинона, взятый на титрование, в мл.

При анализе таблеток пользуются формулой: $x' = \frac{v \cdot 16{,}5 \cdot v_1 \cdot d}{a \cdot v_2}$, где x — содержание викасола в мг в 1 таблетке; 16,5 — количество викасола в мг, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора гипосульфита; d — средний вес 1 таблетки в г, остальные обозначения см. выше.

Весовой метод (по IX Госфармакопее СССР)

Около 0,3 г препарата (точная навеска) растворяют в 15 мл воды, переносят в делительную воронку, прибавляют 10 мл 0,1 н. раствора едкого натра и извлекают хлороформом 2 раза по 20 мл. В делительную воронку приливают еще 5 мл 0,1 н. раствора едкого натра и повторяют извлечение хлороформом еще 3 раза по 20 мл. Хлороформные извлечения после подсушивания их 0,5 г безводного сульфата натрия фильтруют через вату во взвешенную колбу. Вату промывают 3—4 раза хлороформом по 5 мл и фильтрат присоединяют к хлороформным извлечениям. Хлороформ отгоняют на водяной бане до объема 1—2 мл, затем осторожно удаляют его продуванием воздухом, остаток сушат до постоянного веса в эксикаторе над серной кислотой. Вес остатка, умноженный на 1,9183, соответствует количеству викасола во взятой навеске.

Колориметрический метод определения викасола в таблетках

В связи с наличием в молекуле викасола 2-метил-1,4-нафтохинона, обладающего CO-группой, указанное соединение легко образует с 2,4-динитрофенилгидразином соответствующий озазон по реакции:

Реакция образования озазона метинона была использована в 1943 г. в Научно-исследовательском институте полупродуктов и красителей для весового определения метинона. Озазон метинона обладает интенсивной окраской, что позволяет также проводить определение колориметрическим методом. Основываясь на этом, Огава (Ogawa, 1953) разработал метод колориметрического определения метинона. Этот метод был проверен и приспособлен нами для колориметрического определения викасола в таблетках. Ниже излагается пропись метода в том виде, как он применяется в нашей лаборатории.

Техника метода. На технохимических весах взвешивают 30—50 таблеток с викасолом, устанавливая, таким образом, средний вес 1 шт. Из хорошо измельченной пробы отбирают навеску в количестве около 2 г, растворяют в воде, фильтруют, фильтр промывают небольшим количеством воды. К фильтрату добавляют по каплям, осторожно, 1% раствор NaOH или KOH до пол-

ноты осаждения метинона. Смесь фильтруют, осадок количественно переносят на фильтр, промывают на фильтре 2—3 раза сильно охлажденной водой, фильтрат испытывают на полноту осаждения.

Осадок на фильтре растворяют в 96% этиловом спирте, раствор переносят количественно в мерную колбу емкостью 100 мл, фильтр промывают спиртом, сливая последний в ту же колбу; объем раствора в колбе доводят спиртом до метки.

В пробирку берут 1 мл полученного раствора, прибавляют 1,5 мл 0,1% раствора 2,4-динитрофенилгидразина, растворенного в 2 н. HCl. Пробирку закрывают пробкой со вставленным в нее воздушным холодильником, и содержимое ее нагревают в течение 15 минут на водяной бане при 70—80°.

Образовавшийся осадок озазона после охлаждения содержимого пробирки под струей воды отфильтровывают, осадок на фильтре промывают 8—10 мл 2 н. HCl, затем 8—10 мл воды. Воронку с фильтром вставляют в горло мерной колбы емкостью 25 мл и осадок растворяют в смеси аммиака с ацетоном (1 ч. 25% раствора аммиака и 4 ч. ацетона). После промывки фильтра этой же смесью раствор в колбе доводят до метки и хорошо взбалтывают.

Из полученного раствора в кювету фотоколориметра отбирают 1 мл, прибавляют 9 мл аммиачно-ацетоновой смеси и окраску раствора измеряют в фотоколориметре со светофильтром $\lambda = 620$ mμ.

Расчет содержания викасола в миллиграммах в 1 таблетке (x) производят по формуле:

$$x = \frac{c \cdot v \cdot v_1 \cdot d \cdot 1{,}9182}{a \cdot 1 \cdot 1000},$$

где c — найденное по калибровочному графику количество метинона в γ, соответствующее плотности испытуемого раствора;
a — навеска в г;
v — разведение викасола в мл;
1 — количество раствора, взятое на реакцию, в мл;
v_1 — разведение метинона в мл;
d — средний вес 1 таблетки в г;
1000 — пересчет в мг;
1,9182 — коэффициент пересчета метинона в викасол.

Составление калибровочного графика. Навеску метинона в количестве 10 мг растворяют в 100 мл 96% этилового спирта. Из полученного раствора отбирают 1 мл и далее проводят реакцию с раствором 2,4-динитрофенилгидразина, как описано выше.

В ряд пробирок отбирают следующие количества полученного аммиачно-ацетонового раствора озазона метинона и аммиачно-ацетоновой смеси (табл. 9).

Таблица 9

Составление калибровочного графика для метинона

№ пробирки	В миллилитрах		Содержание метинона в γ
	раствор озазона	смесь	
1	0,25	9,75	1,0
2	0,50	9,50	2,0
3	0,75	9,25	3,0
4	1,25	8,75	5,0
5	2,50	7,50	10,0
6	3,25	6,75	13,0
7	3,75	6,25	15,0
8	4,00	6,00	16,0

Измеряют на фотоколориметре плотность каждого полученного раствора со светофильтром $\lambda = 620$ mμ, по оси ординат на графике откладывают найденные соответствующие им плотности экстинкции (E), а по оси абсцисс — соответствующие им концентрации метинона в γ (a).

Правильно построенный график имеет вид прямой линии.

Методы контроля в производстве витамина Р

К витамину Р относят ряд веществ, обладающих капилляроукрепляющим действием, участвующих в окислительно-восстановительных процессах и, возможно, выполняющих другие важные функции в организме. В природе эти вещества представлены очень широко, как в виде агликонов, так и гликозидов. Установлено, что вещества, оказывающие Р-витаминное действие, в основе своей имеют γ-бензопиреновое кольцо, сконденсированное с бензольным кольцом; в α-положении к γ-бензопиреновому кольцу присоединяется фенильное кольцо.

Ряд веществ с Р-витаминными свойствами выделен в чистом виде; некоторые из них получаются путем химического синтеза. К наиболее изученным Р-витаминным веществам следует отнести рутин, гесперидин, эриодиктиол, кверцетин и группу катехинов.

Промышленным способом получения Р-витаминных веществ является выделение их из естественных источников. Так, для получения рутина и кверцетина используют цветы и листья гречихи, для получения рутина — почки и цветы софоры японской, для получения гесперидина и эриодиктиола — кожуру цитрусовых плодов, для получения катехинов — отходы чайной промышленности.

Строение некоторых Р-витаминных веществ следующее:

Рутин (флавонол)

Кверцетин (агликон рутина)

Эриодиктиол (флавонон)

Монометиловый эфир эриодиктиола, гесперидин (агликон гесперидина)

$R = C_{12}H_{21}O_9$ (дисахарид)

Гесперидин (флавонон)

L-эпикатехингаллат

Физико-химические свойства веществ, обладающих Р-витаминным действием

Показатель	Характеристика			
	флавонолы		флавононы	
	рутин	кверцетин	гесперидин	эриодиктиол
Состояние вещества	Желто-зеленый мелкокристаллический порошок без вкуса и запаха	Лимонно-желтые кристаллы	Бесцветные мелкие кристаллы	Слегка окрашенные иглы
Формула	$C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$	$C_{15}H_{10}O_7$	$C_{28}H_{34}O_{17}+H_2O$	$C_{15}H_{12}O_6+2{,}5\ H_2O$
Молекулярный вес	610	302	615	333
Температура плавления	187—192°	312—316°	251—252°	267°
Растворимость	Практически нерастворим в воде. Хорошо растворим в метаноле, изопропаноле и частично в ацетоне (только агликон). Нерастворим в эфире, бензоле, толуоле и др.	Растворим в ацетоне, этаноле, метаноле, изопропаноле. Нерастворим в эфире, бензоле, толуоле, четыреххлористом углероде	Растворим в пиридине, аммиаке, ледяной уксусной кислоте. Нерастворим в эфире, спиртах, бензоле, хлороформе, воде, ацетоне, сероуглероде	Растворим в эфире, спирте, уксусной кислоте. Нерастворим в органических растворителях, кроме эфира
Максимум абсорбции	258, 363 mμ	256, 375 mμ	278, 324 mμ	290,326 mμ

L-эпигаллокатехин

L-эпигаллокатехингаллат

L-эпикатехин

Методы анализа Р-витаминных веществ основаны на хроматографическом их разделении, спектрофотометрическом или колориметрическом определении, а также на весовом определении продуктов гидролиза гликозидов (например, рутина).

В основу одного из колориметрических методов определения флавонолов положена реакция Уильсона (Wilson, 1942) с лимонно-борным реактивом, в ходе которой, по мнению Херхаммера и Хензеля (Hörhammer, Hanse, 1935), образуется пятичленный клешневидный борный комплекс (см. стр. 282).

Этот комплекс обладает интенсивной окраской и большой устойчивостью, однако химизм этой реакции еще в достаточной степени не изучен.

Реакция образования борного комплекса с флавонолами была применена А. Р. Гусевой и М. Н. Нестюк

(1953) к разработанному ими методу определения кверцетина в листьях эуккомии. Нами на основе этого принципа был разработан метод определения флавонолов в сырье, используемом для получения рутина (гречиха, софора и пр.), и в готовом продукте.

Кроме того, А. А. Сиймом на Таллинском фармацевтическом заводе был разработан упрощенный метод, пригодный для контроля готового продукта, основанный на том, что рутин, будучи подвергнут гидролизу с соляной кислотой, отщепляет сахарный остаток (рутинозу), в результате чего остающийся кверцетин выпадает в осадок и может быть количественно определен:

Кроме того, для целей идентификации применяются способы, основанные на хроматографическом разделении указанных соединений.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОЛОВ (РУТИНА И КВЕРЦЕТИНА) В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

(разработан во ВНИВИ В. А. Девятниным и Г. А Федоровой, 1959)

Составление калибровочного графика. В мерную колбу емкостью 100 мл помещают точную навеску многократно перекристаллизованного рутина в количестве 10 мг, растворяют в 4 мл абсолютного этилового спирта, доводят сухим ацетоном до метки и тщательно перемешивают.

В кюветы фотоколориметра помещают полученный раствор, лимонно-борный реактив и ацетон в количествах, указанных в табл. 10.

Таблица 10

Составление калибровочного графика флавонолов

№ раствора	Стандартный раствор	Лимонно-борный реактив	Сухой ацетон	Общий объем	Содержание флавонолов в растворе в γ
	в миллилитрах				
1	0,1	0,4	9,5	10,0	10
2	0,3	1,2	8,5	10,0	30
3	0,5	2,0	7,5	10,0	50
4	0,7	2,8	6,5	10,0	70
5	0,9	3,6	5,5	10,0	90
6	1,0	4,0	5,0	10,0	100

Окраску растворов № 1—6 измеряют на электрофотоколориметре со светофильтром 470 mμ, откладывая на графике по оси абсцисс концентрацию стандарта в гаммах, а по оси ординат — показания плотности, и строят калибровочный график, соединяя нанесенные точки линией. Правильно построенный график имеет вид прямой линии.

Техника метода. Из высушенного и тщательно измельченного растительного материала берут точную навеску в количестве 1—3 г. Навеску помещают в пакет из фильтровальной бумаги, а затем в экстрактор аппарата Сокслета и экстрагируют хлороформом до прекращения

окрашивания растворителя[1]. По окончании экстракции пакет с навеской подсушивают в вытяжном шкафу до удаления запаха хлороформа, содержимое пакета количественно переносят в круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, и экстрагируют с помощью 60 мл сухого метилового спирта на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Экстракт сливают в мерную колбу емкостью 200 мл. Извлечение флавонолов повторяют таким же путем еще 2 раза теми же объемами спирта. Объединенные экстракты доводят в мерной колбе метиловым спиртом до объема, перемешивают и фильтруют. Из фильтрата отбирают 10 мл в небольшую колбу, соединенную с холодильником Либиха, метиловый спирт отгоняют досуха, к остатку из пипетки прибавляют 1 мл метилового спирта, растворяют в нем остаток, полученный раствор количественно переносят в мерную колбу емкостью 25 мл; отгоночную колбу дополнительно промывают сухим ацетоном, сливая ацетон в мерную колбу; объем раствора в колбе доводят ацетоном до метки и тщательно перемешивают.

Метанольно-ацетоновый раствор фильтруют; из фильтрата отбирают 2 мл в кювету фотоколориметра, туда же приливают 8 мл лимонно-борного реактива, смешанного непосредственно перед употреблением; кювету с содержимым оставляют в темноте на 10 минут, образовавшуюся окраску измеряют на фотоколориметре со светофильтром 470 mμ. Для установки прибора на нуль используют сухой ацетон. По калибровочному графику находят соответственно содержание флавонолов в испытуемом растворе.

Контролем на окраску служит смесь, состоящая из 2 мл метанольно-ацетонового испытуемого раствора и 8 мл сухого ацетона. Полученное показание для контроля вычитают из показания для испытуемого.

Содержание флавонолов (рутина и кверцетина) в процентах (x) рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{c \cdot v_1 \cdot v_3 \cdot 100}{a \cdot v_2 \cdot v_4 \cdot 1000 \cdot 1000},$$

[1] Извлечение красящих веществ иногда протекает длительное время. Целесообразно в аппарат Сокслета загружать сразу несколько проб.

где: c — найденное по калибровочному графику содержание флавонолов в γ;
a — навеска в г;
v_1 — объем метанольного экстракта в мл;
v_2 — объем метанольного экстракта, взятый для анализа, в мл;
v_3 — объем метанольно-ацетонового раствора в мл;
v_4 — объем метанольно-ацетонового раствора, взятый на реакцию, в мл;
100 — пересчет в %;
1000 — пересчет в мг;
1000 — пересчет в г.

При сокращении формула приобретает следующее значение:

$$x = \frac{c \cdot v_1 \cdot v_3}{a \cdot v_2 \cdot v_4 \cdot 10\,000}.$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОЛОВ В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ПРОДУКТЕ

Колориметрический метод

(по прописи В. А. Девятнина и Г. А. Федоровой, химико-аналитическая лаборатория ВНИВИ)

0,02 г кристаллического препарата растворяют в мерной колбе емкостью 200 мл в 8 мл абсолютного метилового спирта и доводят до метки сухим ацетоном. После тщательного перемешивания раствор, если нужно, фильтруют, отбирают 2 мл в кювету фотоколориметра и далее поступают, как указано в предыдущей методике.

Контрольную пробу на естественную окраску не ставят.

Содержание флавонолов (рутина и кверцетина) в в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{c \cdot v \cdot 100}{a \cdot v_1 \cdot 1000 \cdot 1000},$$

где c — найденное по калибровочному графику содержание флавонолов в γ;
a — навеска в г;
v — объем раствора в мл;

v_1 — объем раствора, взятый на реакцию, в мл;
100 — пересчет в %;
1000 — пересчет в мг;
1000 — пересчет в г.

Весовой метод

(по IX Госфармакопее СССР)

1 г препарата (точная навеска) кипятят со 100 мл 0,5% раствора соляной кислоты в колбе с обратным холодильником в течение 30 минут. Раствор охлаждают, выделившийся осадок собирают на предварительно взвешенный стеклянный фильтр (№ 3 или 4), осадок промывают 3—4 раза водой по 10 мл до отрицательной реакции на хлор-ион и сушат при 110° до постоянного веса.

Содержание рутина в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = n \cdot 2{,}019 \cdot 100,$$

где n — вес осадка в г;
2,019 — коэффициент пересчета кверцетина на рутин;
100 — пересчет в %.

Спектрофотометрический метод определения рутина и кверцетина

Навеску кристаллического препарата в количестве 0,01 г помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, растворяют в этиловом спирте [1]; объем раствора в колбе доводят до метки (первое разведение). Отбирают 5 мл раствора и доводят в мерной колбе емкостью 50 мл спиртом (второе разведение). Из полученного раствора (второе разведение) отбирают в кювету спектрофотометра и измеряют поглощение раствором света при 375, 363, 258 и 256 mμ, используя в качестве контроля этиловый спирт

Для рутина:

максимум$_1$ при $\lambda = 363$ mμ$\cdot E^{1\%}_{1\,см} = 327$
максимум$_2$ при $\lambda = 258$ mμ$\cdot E^{1\%}_{1\,см} = 380$

[1] Употребляют этиловый спирт, перегнанный для спектральных целей

Для кверцетина:

максимум$_1$ при $\lambda = 375$ mμ$\cdot E^{1\%}_{1\,см} = 843{,}7$
максимум$_2$ при $\lambda = 256$ mμ$\cdot E^{1\%}_{1\,см} = 702{,}5$

Вычисление экстинкции 1% раствора для кюветы 1 см производят по формуле:

$$E^{1\%}_{1\,см} = \frac{E_1 \cdot v_1 \cdot v_2}{a \cdot v_3 \cdot 100},$$

где E_1 — экстинкция найденная;
a — навеска в г;
v_1 — объем первого разведения в мл;
v_2 — объем второго разведения в мл;
v_3 — объем раствора, взятый для второго разведения в мл;
100 — пересчет на 1% раствор.

Содержание рутина или кверцетина в препарате в процентах (x_1) вычисляют по формуле:

$$x_1 = \frac{E_1 \cdot 100}{E_{ст.}},$$

где E_1—$E^{1\%}_{1\,см}$ — экстинкция найденная;
$E_{ст.}$ — $E^{1\%}_{1\,см}$ для стандарта (см. данные).

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД РАЗДЕЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОЛОВ И ФЛАВОНОНОВ

(разработан В. А. Девятниным и Г. А. Федоровой, 1961)

Подлежащий изучению растительный материал высушивают в сушильном шкафу и измельчают. Навеску сухого материала в количестве 1—5 г помещают в пакет из фильтровальной бумаги и экстрагируют в аппарате Сокслета сухим хлороформом с целью удаления пигментов и смол. Экстракцию проводят до обесцвечивания растворителя, после чего пакет с навеской слегка подсушивают до удаления запаха хлороформа.

Навеску из пакета количественно переносят в круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, и экстрагируют на кипящей водяной бане с помощью 60 мл сухого метилового спирта в течение 30 минут. Экстракт сливают в мерную колбу емкостью 200 мл.

Извлечение Р-витаминных веществ повторяют таким же путем еще 2 раза теми же объемами спирта. Объединенные экстракты доводят в мерной колбе метиловым спиртом до объема, перемешивают и фильтруют.

Из фильтрата отбирают микропипеткой 0,02 мл и наносят в виде пятна на полоску фильтровальной хроматографической бумаги плотностью 120 г/м² на расстоянии 3 см от ее нижнего конца. Полоску бумаги помещают в герметически закрытый сосуд (цилиндр, вегетационный сосуд, специальная камера), подвешивая ее на стеклянный или стальной крючок к пробке сосуда. На дно сосуда наливают водный 60% раствор уксусной кислоты, полоску бумаги нижним концом (на глубину 1 см) помещают в растворитель, который постепенно поднимается по бумаге и разделяет находящиеся в смеси вещества.

В случае применения радиальной хроматографии диск из фильтровальной бумаги помещают на вставку из фарфора или плексиглаза в эксикатор, на дно которого наливают растворитель. В центр диска через отверстие в бумаге и вставке помещают туго скрученный фитиль из фильтровальной бумаги, опущенный нижним концом в растворитель. На расстоянии 3 см от центра на фильтровальном диске по очерченной карандашом окружности помещают пятна исследуемых веществ. Растворитель, поднимаясь по фитилю, доходит до бумажного диска, растекается равномерно по нему и разделяет кольцеобразно вещества. Разгонка веществ продолжается от 3 до 6 часов. После разгонки хроматограмму высушивают и обрызгивают из пульверизатора 1% спиртовым раствором хлористого алюминия.

Проявленные вещества дают в ультрафиолетовом свете характерную флуоресценцию:

рутин — желтовато-коричневую,	R_f—0,77
кверцетин — светло-зеленую,	R_f—0,43
гесперидин — желто-зеленую,	R_f—0,87
эриодиктиол— голубоватую,	R_f—0,78 [1]

Пятна веществ, проявленные раствором хлористого алюминия, для дальнейшего количественного определения флавоновых веществ не могут быть использованы. Поэтому параллельно проявляемой хроматограмме в тех же условиях ставят опыт с контрольной хроматограммой, которую после высушивания не проявляют, как описано, а на нее накладывают проявленную хроматограмму, очерчивают пятна и точно по ней аккуратно вырезают участки на непроявленной хроматограмме. Вырезанные кусочки бумаги тщательно измельчают ножницами, помещают в точно отмеренное количество (5 или 10) миллилитров абсолютного этилового спирта и экстрагируют при взбалтывании вещества, адсорбированные бумагой.

[1] Если на хроматограмме возникают дополнительные пятна, их следует отнести к неидентифицированным веществам

Профильтрованные элюаты помещают в кювету спектрофотометра и измеряют поглощения для растворов рутина, кверцетина, гесперидина и эриодиктиола.

Предварительно снимают на спектрофотометре абсорбционные кривые для чистых многократно перекристаллизованных до получения постоянной температуры плавления веществ (стандарт), пользуясь этими кривыми при расчете содержания Р-витаминных веществ в хроматографированном материале (желательно иметь наряду с этим контрольную хроматограмму со стандартными веществами).

Расчет содержания веществ в хроматографированном объекте в процентах (x) производят по формуле:

$$x = \frac{E \cdot v \cdot v_2 \cdot 100}{a \cdot v_1 \cdot E_1 \cdot 100},$$

где E — экстинкция найденная;
a — навеска в г;
v — разведение навески в мл;
v_1 — объем раствора, нанесенный на хроматограмму, в мл;
v_2 — объем элюата в мл;
E_1 — $E^{1\%}_{1\,см}$ для стандарта;
100 (в числителе) — перевод в %;
100 в (знаменателе) — перевод показания спектрофотометра в $E^{1\%}_{1\,см}$.

УПРОЩЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОВ

В контроле производства в целях ориентировочного определения качества продукции могут быть использованы упрощенные методы, основанные на том, что флавоновые гликозиды дают со щелочью окрашенные продукты (по-видимому, соединения типа халконов), которые

могут быть определены колориметрическим путем. Этот способ был первоначально предложен Лоренцом и Арнольдом (Lorenz, Arnold, 1941) для определения витамина Р в цитрусовых плодах. Он не может иметь широкого распространения и лишь для некоторых продуктов дает достаточно удовлетворительные результаты (драже с витамином Р, плоды шиповника и некоторые другие).

Определение флавонов в драже и таблетках с витамином Р

(разработано В. А. Вадовой и В. А. Плинер, Ленинградский филиал ВНИВИ)

Точную навеску мелкоизмельченной в ступке средней пробы драже или таблеток с витамином Р в количестве 1 г помещают в колбу емкостью 100 мл, добавляют 40 мл 2% водного раствора КОН; колбу закрывают пробкой, снабженной воздушным холодильником, помещают в кипящую водяную баню и выдерживают в ней 15 минут. За это время в смеси, находящейся в колбе, развивается коричневое окрашивание. По истечении указанного времени колбу вынимают, содержимое ее охлаждают струей воды, а затем количественно переносят в мерную колбу емкостью 50 мл при помощи 2% водного раствора щелочи и доводят объем раствора в колбе щелочью до метки. После тщательного перемешивания раствора из него отбирают пипеткой 5 мл, переносят в пробирку или стакан, добавляют 5 мл дистиллированной воды; смесь снова перемешивают, если нужно, фильтруют; в прозрачном фильтрате определяют интенсивность окраски при помощи колориметра Дюбоска, пользуясь в качестве стандарта 0,05 н. раствором йода.

Стандартный раствор устанавливают на 15 мм; 1 мл стандартного раствора соответствует по окраске 0,24 мг витамина Р[1].

Содержание витамина Р в миллиграммах в 1 шт. драже (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{0,24 \cdot h_1 \cdot v \cdot 2 \cdot d}{h_2 \cdot a},$$

[1] Моносахариды при обработке щелочью развивают слабо желтую окраску. По данным В. А. Вадовой, 1 г глюкозы дает окраску, соответствующую 13,65 мг флавонов. Это следует иметь в виду при анализе объектов, богатых моносахаридами.

где 0,24 — количество флавонов, отвечающее по окраске 1 мл стандартного 0,05 н. раствора йода, в мг;
h_1 — высота столба стандартного раствора в мм (15);
h_2 — высота столба испытуемого раствора в мм;
v — объем раствора в мл;
d — средний вес 1 шт. драже в г;
a — навеска драже в г;
2 — разведение.

Определение флавонов в плодах шиповника

(по прописи В. А. Вадовой и биохимической лаборатории ВНИВИ)

Навеску 0,5—1 г мелкоизмельченных сухих или 3—5 г свежих плодов шиповника, освобожденных от семян и волосков[1], помещают в ступку, добавляют небольшое количество стеклянного порошка. В мерный цилиндр вносят 40 мл 2% водного раствора КОН, из него отливают в ступку 3—5 мл и тщательно растирают содержимое ступки до получения однородной суспензии. Содержимое ступки количественно переносят в коническую колбу емкостью 100 мл, смывая ступку и пестик раствором щелочи из цилиндра. Объем содержимого колбы доводят оставшимся в цилиндре раствором щелочи до 40 мл, колбу снабжают пробкой с воздушным холодильником и содержимое ее нагревают 15 минут на кипящей водяной бане. По истечении указанного времени колбу вынимают, содержимое ее охлаждают струей воды и количественно переносят в мерную колбу емкостью 50 мл, смывая остаток смеси в колбе 2% раствором КОН.

Объем содержимого мерной колбы доводят раствором щелочи до метки и после тщательного перемешивания фильтруют, отбирают 10 мл фильтрата в стаканчик колориметра Дюбоска и сравнивают окраску испытуемого раствора со стандартным 0,05 н. раствором йода, как указано в прописи предыдущего метода.

Если необходимо, фильтрат можно разбавить водой, учитывая дополнительное разведение при расчете полученных результатов.

[1] Вес перикарпия, семян и волосков учитывают при последующих расчетах содержания флавонов в цельных плодах.

Содержание флавонов в испытуемом образце в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{0,24 \cdot h_1 \cdot v \cdot 100}{a \cdot h_2 \cdot 1000},$$

где 0,24 — количество флавонов, отвечающее по окраске 1 мл стандартного 0,05 н. раствора йода, в мг;
h_1 — высота столба стандартного раствора в мм;
v — объем раствора в мл;
100 — пересчет в %;
h_2 — высота столба испытуемого раствора в мм;
a — навеска в г;
1000 — пересчет в г.

Примечание Так как в шиповнике редуцирующие вещества имеют фенольный характер, поправка на моносахариды во внимание не принимается.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАТЕХИНОВ В ПРЕПАРАТАХ

Катехины в препаратах могут быть определены колориметрическим путем и титрованием по методу Левенталя, предложенному А. Л. Курсановым и М. Н. Запрометовым (Институт физиологии растений АН СССР). Колориметрический метод основан на реакции сочетания фенильного радикала катехинов с диазотированным п-нитроанилином. Можно предположить, что это сочетание протекает следующим образом:

HO, O, OH, OH, OH, CH_2, OH + 2NaON = N— —NO_2 →

HO, O, N = N — —NO_2, — OH, OH, CH_2, OH + NaOH

Главным направлением реакции является сочетание с фенолами в пара-положении к окси-группе. Ввиду большой реакционной способности п-нитроанилина сочетание может произойти и в орто-, а также в орто- и мета-положении. В результате получается диазосоединение, обладающее интенсивной окраской, как это может иметь место, например, в случае эпикатехингаллата:

HO, O, OH, — OH, OH, OH, CH_2, OH + 2NaON = N— —NO_2→

HO, O, N = N— —NO_2, — OH, N = N— — NO_2, OH, CH_2, OH + 2NaOH

Образующуюся окраску сравнивают со стандартом.

Колориметрический метод определения суммы катехинов в препаратах катехинов из чайного листа

(разработан В. А. Девятниным и Г. А. Федоровой во ВНИВИ)

Составление калибровочного графика. Точную навеску 9,6 мг L-эпигаллокатехингаллата растворяют в мерной колбе емкостью 200 мл в воде, доводят раствор водой до метки и тщательно перемешивают. В кюветы фотоколориметра помещают полученный раствор и раствор диазотированного п-нитроанилина в количествах, указанных в табл. 11.

Через 5 минут после добавления реактива окраску каждого из полученных растворов (№ 1—4) измеряют на электрофотоколориметре со светофильтром 440 mμ, откладывая на графике по оси абсцисс концентрацию, а по оси ординат — плотности, и строят калибровочный график, соединяя нанесенные на бумагу точки. Правильно построенный график имеет вид прямой линии.

В качестве контроля на окраску используют раствор, состоящий из 2 мл диазотированного п-нитроанилина в 60% растворе уксусной кислоты и 2 мл воды. Показания контрольного опыта вычитают из показаний для раствора катехина. Для установки прибора на нуль используют дистиллированную воду.

Таблица 11

Составление калибровочного графика для катехинов

№	В миллилитрах			Содержание L-эпигаллокатехингаллата в γ
	раствор катехина	раствор п-нитроанилина	общий объем	
1	0,1	9,9	10,0	4,8
2	0,3	9,7	10,0	14,4
3	0,5	9,5	10,0	24,0
4	0,7	9,3	10,0	33,6

Техника метода. Навеску препарата катехинов в количестве 0,01 г переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, растворяют в воде и доводят водой до метки. После тщательного перемешивания раствора отбирают 1 мл в мерную колбу емкостью 25 мл и доводят водой до метки. Из второго раствора отбирают в кювету фотоколориметра 2 мл, добавляют 8 мл свежеприготовленного уксуснокислого раствора диазотированного п-нитроанилина, кювету с содержимым оставляют на 5 минут, после чего образовавшуюся окраску измеряют на фотоколориметре со светофильтром 440 mμ. В качестве контроля на окраску используют раствор, состоящий из 2 мл диазотированного п-нитроанилина, как указано при составлении калибровочного графика.

Содержание катехинов в препарате в пересчете на L-эпигаллокатехингаллат в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{c \cdot v \cdot v_2 \cdot 100}{a \cdot v_1 \cdot 1000 \cdot 1000},$$

где c — найденное по калибровочному графику содержание катехинов в γ;

a — навеска в г;

v — объем испытуемого раствора в мл;

v_1 — количество испытуемого раствора, взятое для второго разведения, в мл;

v_2 — второе разведение в мл;

100 — пересчет в %;

1000 — пересчет в мг;

1000 — пересчет в г.

Объемный метод определения витамина Р в препарате катехинов

(по МРТУ-42 № 2819-61)[1]

Около 0,1 г препарата (точная навеска) растворяют в небольшом количестве воды в мерной колбе емкостью 100 мл, раствор доводят водой до метки и тщательно перемешивают. 10 мл приготовленного раствора вносят в большую фарфоровую чашку, содержащую 900 мл воды и 25 мл раствора индигокармина. Титруют при тщательном помешивании стеклянной палочкой 0,1 н. раствором $KMnO_4$, вначале быстро приливая основное количество $KMnO_4$, а затем — по каплям до перехода окраски от синей в зеленовато-желтую и затем в желтую.

Параллельно ставят контрольный опыт на реактивы в таких же условиях, без испытуемой пробы.

Содержание витамина Р в препарате в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(А - Б) \cdot 6{,}4 \cdot v_1 \cdot 100}{a \cdot v_2 \cdot 1000},$$

где $А$ — количество 0,1 н. раствора $KMnO_4$, пошедшее на титрование пробы, в мл;

$Б$ — количество 0,1 н. раствора $KMnO_4$, пошедшее на титрование контрольного опыта, в мл;

v_1 — объем, до которого доведена навеска, в мл;

v_2 — количество раствора, взятое на титрование, в мл;

a — навеска в г;

[1] Метод рекомендован А. Л. Курсановым и М. Н. Запрометовым (Институт физиологии растений АН СССР).

6,4 — количество катехинов, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора $KMnO_4$, в мг;
100 — пересчет в %;
1000 — пересчет в г.

Определение витамина Р в таблетках с катехинами и аскорбиновой кислотой

(по ВТУ МО 12-57)[1]

Из подготовленной для анализа средней пробы таблеток отбирают навеску с таким расчетом, чтобы в ней содержалось около 0,1 г витамина Р, растворяют в воде в мерной колбе емкостью 100 мл и доводят водой до метки. После тщательного перемешивания раствор фильтруют через бумажный фильтр Из фильтрата отбирают 1 мл в мерную колбу емкостью 50 мл, туда же добавляют 5 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH = 6,2—6,3), 2 мл железотартратного реактива и доводят водой до метки. После тщательного перемешивания интенсивность

Таблица 12

Пересчет показаний шкалы фотоколориметра в миллиграммах витамина Р

Показания шкалы	Витамин Р в мг	Показания шкалы	Витамин Р в мг	Показания шкалы	Витамин Р в мг
33,6	104,2	37,0	92,1	40,4	81,8
33,8	103,5	37,2	91,8	40,6	81,0
34,0	102,7	37,4	91,1	40,8	80,6
34,2	101,9	37,6	90,4	41,0	80,2
34,4	101,1	37,8	89,6	41,2	79,3
34,6	100,4	38,0	88,8	41,4	79,1
34,8	99,6	38,2	88,4	41,6	78,5
35,0	98,8	38,4	88,0	41,8	77,5
35,2	98,4	38,6	87,3	42,0	77,1
35,4	97,7	38,8	86,5	42,2	76,7
35,6	96,9	39,0	86,1	42,4	76,2
35,8	96,1	39,2	85,7	42,6	75,6
36,0	95,1	39,4	84,9	42,8	75,0
36,2	95,0	39,6	84,1	43,0	74,6
36,4	94,2	39,8	83,4	43,2	74,0
36,6	93,5	40,0	83,0	43,4	73,0
36,8	92,7	40,2	82,6	43,6	73,1

[1] Метод разработан на Щелковском витаминном заводе

возникшей фиолетовой окраски измеряют при помощи электрофотоколориметра, пользуясь красным светофильтром.

Показания шкалы прибора перечисляют на миллиграммы витамина Р во взятом для анализа количестве вещества по табл. 12.

Содержание витамина Р в 1 шт. таблеток в миллиграммах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{c \cdot d}{a},$$

где c — найденное по таблице содержание витамина Р в мг;
d — средний вес 1 шт. таблеток в г;
a — навеска в г.

Методы контроля в производстве каротина (синтетического и природного)

В контроле полупродуктов синтеза каротина используются методы анализа псевдоионона, бета-ионона и альдегида C_{14}, описанные ранее в разделе «Методы контроля в синтезе витамина А». Ниже описываются разработанные в химико-аналитической лаборатории ВНИВИ И. А Солуниной методы анализа альдегида C_{14} в присутствии его диэтилацеталя, альдегида C_{16} и его диэтилацеталя, бутилвинилового и этилпропенилового эфира, а также анализ каротина

ЭТИЛПРОПЕНИЛОВЫЙ ЭФИР

$CH_3-CH=CHOC_2H_5$

$C_5H_{10}O$
М. вес 86

Бесцветная легко летучая жидкость с резким запахом. В очень чистом состоянии незначительно растворим в воде. Смешивается со многими органическими растворителями. Т. кип 69,1—69,4°. Уд. вес 0,7754 (при 20°), $[\alpha]_D^{20}$ — 1,3986.

Двойная связь в пропениловом эфире очень легко вступает в реакции присоединения, алкоксигруппа сравнительно мало реакционно способна. На этом основан метод его количественного определения изложенный ниже (стр. 304).

АЛЬДЕГИД β-C_{14}

2 метил-4-(2, 6, 6,-триметилциклогексаи-1-ил-тетра-2-еналь-1)

H_3C CH_3 CHO CH_3 CH_3

$C_{14}H_{22}O$
М вес 206,32

Светло-желтая маслянистая жидкость. Т. кип. 52—55° при 10^{-3} мм, n_D^{20} = 1,5111. Легко растворим в органических растворителях, плохо — в воде. Абсорбционный максимум при 230 mμ $E_{1\,см}^{1\%}$ =956.

Точную навеску вещества в количестве 50—100 мг, взятую в мерную колбу емкостью 25 мл, в которую предварительно налито около 10 мл 96% этанола, растворяют в 96% этаноле, доводят объем раствора до метки и тщательно перемешивают (основной раствор).

Из этого раствора для определения альдегида C_{14} в колбу с притертой пробкой отбирают количество раствора, соответствующее содержанию в нем 2—4 мг альдегида C_{14}, доводят объем 96% этанолом до 10 мл, затем добавляют 9 мл 0,5 М водного раствора $(C_2H_5)_4$ NOH и 1 мл 0,1% раствора желатины. Раствор наливают в ячейку полярографа, пропускают в течение 5 минут ток азота и затем производят съемку полярограммы, начиная с—1,2 в.

Процентное содержание альдегида C_{14} (x) определяют по калибровочному графику с учетом навески и принятых разведений по формуле:

$$x = \frac{c \cdot v \cdot v_2 \cdot 100}{a \cdot v_1},$$

где c — количество альдегида C_{14}, найденное по калибровочному графику, в мг;
v — объем, в котором растворена навеска, в мл;
a — навеска вещества в мг;
v_1 — объем раствора, взятый на определение, в мл;
v_2 — общий объем раствора, взятый для полярографирования, в мл.

Построение калибровочного графика. В мерной колбе емкостью 25 мл, в которую предварительно налито около 10 мл 96° этанола, взвешивают 50 мг стандартного препарата альдегида β-C_{14}, растворяют в 96° этаноле, доводят объем раствора до метки и тщательно перемешивают.

Для построения калибровочного графика в колбы с притертой пробкой отбирают количества раствора, соответствующие 1, 2, 3, 4, 5 и 6 мг препарата, и доводят объем каждого из них до 10 мл этанолом, добавляют по 1 мл 0,1% раствора желатины и по 9 мл 0,5 М. раствора $(C_2H_5)_4NOH$.

Полученные растворы поочередно помещают в ячейку полярографа, пропускают ток азота в течение 5 минут и снимают полярографические кривые, начиная с—1,2 в. Высоты волн — величины диффузного тока в микроамперах — наносят на график по оси ординат, а по оси абсцисс откладывают соответствующие им концентрации раствора в миллиграммах.

ДИЭТИЛАЦЕТАЛЬ АЛЬДЕГИДА β-C_{14}

$C_{18}H_{32}O_2$
М. вес 280,25

Маслообразная желтая жидкость, легко растворима в органических растворителях, плохо растворима в воде. Т. кип. 87—90° при 0,2 мм, $n_D^{20} = 1,4773$.

Для определения ацеталя альдегида C_{14} из основного раствора (см. метод определения альдегида C_{14}) отбирают пипеткой в колбу с притертой пробкой количество раствора, соответствующее содержанию в нем 2—4 мг ацеталя, доводят объем до 10 мл 96° этанолом, затем добавляют 9 мл ацетатного буферного раствора с pH=3 и 1 мл 0,1% раствора желатины и снимают полярографические кривые, как описано выше.

Суммарное содержание альдегида C_{14} в процентах (y), имеющегося в образце и полученного из ацеталя, находят по калибровочному графику, составленному по

стандартному препарату ацеталя в пересчете на альдегид C_{14}, на фоне ацетатного буферного раствора pH=3.

Формула расчета следующая:

$$y = \frac{c \cdot v \cdot v_2 \cdot 100}{a \cdot v_1},$$

где c — количество альдегида C_{14}, найденное по калибровочному графику, в мг;
v — объем, в котором растворена навеска, в мл;
a — навеска в мг;
v_1 — объем раствора, взятый на определение, в мл;
v_2 — общий объем раствора, взятый для полярографирования, в мл.

Для расчета процентного содержания ацеталя (z) пользуются следующей формулой:

$$z = (y - x) \cdot 1,3592,$$

где y — суммарное содержание альдегида C_{14}, найденное по калибровочному графику на фоне ацетатного буферного раствора с pH=3, в %;
x — содержание альдегида C_{14}, найденное по калибровочному графику на фоне 0,5 М $(C_2H_5)_4NOH$, в %;
1,3592 — коэффициент пересчета альдегида C_{14} на ацеталь.

АЛЬДЕГИД β-C_{16}

4-метил-6-12,6′, 6′, 6′-триметилциклогексен-1′-ил-(гекса-3,4-диеналь-1).

$C_{16}H_{24}O$
М. вес 232,19

Светло-желтые кристаллы. Т. пл. 77—78°. Легко растворим в органических растворителях, плохо — в воде. Абсорбционный максимум при 276—280 mμ (спирт), $E_{1см}^{\%} = 1347$.

Точную навеску вещества в количестве 50—100 мг, взятую в мерную колбу с притертой пробкой емкостью 25 мл, в которую предварительно налито около 10 мл 96° этанола, растворяют в 96° этаноле, доводят объем раствора до метки и перемешивают (основной раствор).

Для определения альдегида β-C_{16} из этого раствора в колбу с притертой пробкой отбирают количество раствора, соответствующее содержанию в нем 2—3 мг альдегида β-C_{16}, доводят объем 96° этанолом до 10 мл, затем добавляют 9 мл 0,2 М водного раствора $(C_2H_5)_4NOH$ и 1 мл 0,1% раствора желатины.

Раствор помещают в ячейку полярографа, пропускают в течение 5 минут ток азота и снимают полярограмму, начиная с—1,0 в.

Содержание альдегида β-C_{16} (x) в процентах вычисляют по формуле:

$$x = \frac{c \cdot v_2 \cdot v \cdot 100}{a \cdot v_1},$$

где c — количество альдегида β-C_{16}, найденное по калибровочному графику, в мг;
v — объем, в котором растворена навеска, в мл;
a — навеска в мг;
v_1 — объем раствора, взятый на определение, в мл;
v_2 — общий объем раствора, взятый для полярографирования, в мл.

Построение калибровочного графика. В мерной колбе с притертой пробкой емкостью 25 мл, в которую предварительно налито около 10 мл 96° этанола, взвешивают 50 мг стандартного препарата альдегида β-C_{16} (точная навеска), растворяют в 96° этаноле, доводят объем раствора до метки и тщательно перемешивают.

Для построения калибровочного графика в колбы с притертыми пробками отбирают количества раствора, соответствующие 1, 2, 3, 4, 5 и 6 мг альдегида, доводят объем каждого из них до 10 мл 96° этанолом, добавляют по 9 мл 0,2 М раствора $(C_2H_5)_4NOH$ и по 1 мл 0,1% раствора желатины.

Полученные растворы поочередно помещают в ячейку полярографа, пропускают ток азота в течение 5 минут и снимают полярограммы, начиная с—1,0 в. Высота волн—величины диффузионного тока в микроамперах—

наносят на график по оси ординат, а по оси абсцисс откладывают соответствующие им концентрации растворов в миллиграммах.

ДИЭТИЛАЦЕТАЛЬ АЛЬДЕГИДА β-C_{16}

$C_{20}H_{34}O_2$
М. вес 306,27

Желтая маслообразная жидкость, растворимая в органических растворителях, нерастворимая в воде. Т. кип. 135° при 0,1 мм, $n_D^{25} = 1{,}5082$. Абсорбционный максимум при 237 mμ, $E_{1\,см}^{1\%} = 950$ (спирт).

Для определения ацеталя альдегида β-C_{16} из основного раствора (см. метод определения альдегида β-C_{16}) отбирают пипеткой в колбу с притертой пробкой 2—3 мл раствора, соответствующего содержанию в нем 2—4 мг ацеталя, доводят объем до 10 мл 96° этанолом, затем добавляют 9 мл ацетатного буферного раствора с pH=3 и 1 мл 0,1% раствора желатины. Полярографические кривые снимают, начиная с—0,6 в, как описано выше.

Суммарное содержание альдегида β-C_{16} в процентах (y), имеющегося в образце и полученного из ацеталя при омылении его в кислом буферном растворе, находят по калибровочному графику, составленному по стандартному препарату ацеталя, в пересчете на альдегид β-C_{16}, на фоне ацетатного буферного раствора с pH=3. Формула расчета следующая:

$$y = \frac{c \cdot v \cdot v_2 \cdot 100}{a \cdot v_1},$$

где c — количество альдегида β-C_{16}, найденное по калибровочному графику, в мг;
v — объем, в котором растворена навеска, в мл;
a — навеска в мг;
v_1 — объем раствора, взятый на определение, в мл;
v_2 — общий объем раствора, взятый для полярографирования, в мл.

Для расчета процентного содержания ацеталя (z) пользуются следующей формулой:

$$z = (y - x) \cdot 1{,}319,$$

где y — суммарное содержание альдегида β-C_{16}, найденное по калибровочному графику на фоне ацетатного буферного раствора с pH=3, в %;

x — содержание остаточного альдегида β-C_{16}, найденное по калибровочному графику на фоне 0,2 М раствора $(C_2H_5)_4NOH$, в %;

1,319 — коэффициент пересчета альдегида β-C_{16} на ацеталь.

Построение калибровочного графика. В мерной колбе с притертой пробкой емкостью 25 мл, в которую предварительно налито около 10 мл 96° этанола, взвешивают 50 мг стандартного препарата диэтилацеталя альдегида β-C_{16}, растворяют в 96° этаноле, доводят объем до метки и тщательно перемешивают.

Для построения калибровочного графика в колбы с притертыми пробками отбирают количества раствора, соответствующие 1, 2, 3, 4, 5 и 6 мг ацеталя, доводят объем каждого из них до 10 мл 96° этанолом, добавляют по 9 мл ацетатного буферного раствора с pH=3 и по 1 мл 0,1 % раствора желатины.

Полученные растворы поочередно помещают в ячейку полярографа, пропускают в течение 5 минут ток азота и снимают полярограммы, начиная с —0,6 в. Высоты волн—величины диффузионного тока в микроамперах—наносят на график по оси ординат, а по оси абсцисс откладывают соответствующие им концентрации ацеталя в пересчете на альдегид, в миллиграммах.

БУТИЛВИНИЛОВЫЙ И ЭТИЛПРОПЕНИЛОВЫЙ ЭФИРЫ

Точную навеску эфира в количестве 0,05—0,08 г, взятую в колбу с притертой пробкой, в которую предварительно налито 5 мл метанола, заливают 25 мл 0,5 н. солянокислого гидроксиламина и выдерживают в течение 1 часа при комнатной температуре. Образовавшуюся в результате реакции кислоту оттитровывают точным 0,5 н. раствором KOH в присутствии индикатора бром-

фенолового синего до появления синей окраски контрольного опыта, который проводится в тех же условиях.

Расчет содержания эфира в образце в процентах (x) производят по формуле:

$$x = \frac{(v - v_1) \cdot 0{,}5 \cdot M \cdot 100}{a \cdot 1000},$$

где v — количество точного 0,5 н. раствора KOH, пошедшее на титрование опыта, в мл;

v_1 — количество точного 0,5 н. раствора KOH, пошедшее на титрование контроля, в мл;

M — молекулярный вес эфира (бутилвиниловый эфир — 100, этилпропениловый эфир — 86,08);

a — навеска в г.

Примечание. $\frac{0{,}5\ M}{1000}$ — количество эфира, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора KOH в г.

Ртутно-ацетатный метод

Метод основан на реакции ненасыщенных эфиров с избытком ацетата ртути в метаноле при —10°: в результате реакции освобождается уксусная кислота, которую оттитровывают раствором KOH в метаноле. Избыток ацетата ртути превращают в бромид добавлением бромистого натрия.

Точную навеску эфира в количестве 0,05—0,08 г, взятую в колбу с притертой пробкой, в которую предварительно налито 25 мл 4% ацетата ртути в метаноле, выдерживают в ледяной бане (используется баня с кусочками льда в метаноле) в течение 10 минут. Затем в колбу добавляют 2 г кристаллического бромистого натрия, энергично перемешивают до полного его растворения и тотчас же титруют в присутствии 1% раствора фенолфталеина в абсолютном метаноле точным 0,1 М раствором KOH в метаноле до появления розового окрашивания контрольного опыта, который проводят в тех же условиях. Температура раствора при титровании не должна превышать 15°.

Расчет содержания эфира в процентах (x) производят по следующей формуле:

$$x = \frac{(v - v_1)\cdot M\cdot 0{,}1\cdot 100}{a\cdot 1000},$$

где v — количество точного метанольного 0,1 н. раствора КОН, пошедшее на титрование опыта, в мл;

v_1 — количество точного метанольного 0,1 н. раствора КОН, пошедшее на титрование контроля, в мл;

M — молекулярный вес эфира в г (см. выше);

a — навеска в г.

КАРОТИН

Каротин является провитамином А. Образуется в растениях. В организме животного превращается в витамин А. Почти единственным источником для образования витамина А в животном организме являются, по-видимому, каротиноиды растительного происхождения. Наибольшее значение для животного организма имеет β-каротин, обладающий следующим строением:

H_3C CH_3 ... $C-CH=CH-\overset{CH_3}{C}=CH-CH=CH-\overset{CH_3}{C}=CH-CH=$ ... CH_3

$=CH-CH=\overset{CH_3}{C}-CH=CH-CH=\overset{CH_3}{C}-CH=CH-C$ ... H_3C CH_3 ... H_3C

Каротин и его растворы обладают интенсивной желто-оранжевой окраской.

Промышленными препаратами β-каротина является синтетический β-каротин, а также масляные концентраты каротина, получаемого из моркови и витаминной тыквы, а также концентраты каротина из облепихи.

В основе существующих методов определения каротина лежит естественная желтая окраска его растворов, которая легко поддается колориметрированию со стандартными растворами, а также свойство каротина поглощать свет в видимой области спектра.

Физико-химические свойства β-каротина

Показатель	Характеристика
Состояние вещества	Интенсивно оранжево-красные кристаллы ромбической формы с металлическим блеском
Формула	$C_{40}H_{56}$
Молекулярный вес	536,85
Температура плавления	183—184°[1]
Растворимость	В воде нерастворим. В этиловом спирте растворим очень слабо. Растворяется во многих органических растворителях
Оптическая активность	Неактивен
Биологическая активность	В 1 г кристаллического продукта 1 660 000 ИЕ витамина А
Максимум абсорбции	456 mμ (в бензоле) и 465 mμ (в хлороформе)
Флуоресценция	
Коэффициент экстинкции	$E^{1\%}_{1\,см}$ = 2400 (при 455 mμ) и 2396 (при 465 mμ)

[1] 181—182° по Кноблоху.

Каротин в естественных объектах сопровождается другими каротиноидами, многие из которых не обладают провитаминными свойствами. Поэтому методы анализа каротина в естественных объектах предусматривают обязательное отделение сопутствующих примесей, которое осуществляется с помощью хроматографической адсорбции.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В СВЕЖЕМ РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

(по Гост 6604-53)

Первый вариант. Навеску от 1 до 50 г (в зависимости от предполагаемого содержания каротина) растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством

прокаленного и промытого песка или измельченного стекла. Растертый в ступке материал обрабатывают 5—10-кратным по отношению к взятой навеске количеством 96% спирта. Затем в ступку добавляют порциями 20—30 мл бензина[1] или петролейного эфира, смесь снова тщательно растирают, экстракт фильтруют через бумажный фильтр (стараться не переносить осадок на фильтр).

Экстрагирование петролейным эфиром повторяют до тех пор, пока бензин перестанет окрашиваться. Бензиновые (или петролейные) фильтраты переносят в делительную воронку, добавляют несколько миллилитров воды до полного разделения слоев: верхний слой бензиновый (или петролейный), нижний — спиртовой. Спиртовой слой сливают в другую делительную воронку и промывают 2 раза бензином (или петролейным эфиром) порциями по 10 мл. Бензиновые или петролейные вытяжки присоединяют к основному раствору, переносят в колбу и концентрируют на водяной бане в вакууме до 20—30 мл.

К экстракту прибавляют приблизительно равный объем 5% спиртовой щелочи и омыляют в течение 1/2—1 часа на водяной бане с воздушным обратным холодильником при температуре кипения спиртовой щелочи. Омыленный раствор переносят в делительную воронку и туда же прибавляют несколько миллилитров воды до разделения слоев. Смесь взбалтывают и производят отделение бензинового (или петролейного) слоя. Бензиновый (или петролейный) раствор промывают 8—10 раз дистиллированной водой. Отмытый бензиновый (или петролейный) раствор сушат в колбе обезвоженным сульфатом натрия при взбалтывании до исчезновения мутности раствора, затем экстракт фильтруют и сгущают в колбе до объема 5—10 мл. Сгущенный экстракт пропускают под небольшим отрицательным давлением через адсорбционную колонку, наполненную адсорбентом.

Второй вариант. Отличается от первого тем, что вначале проводится омыление навески с последующим переводом неомыляемой фракции в бензин (или петролейный эфир). Указанную в первом варианте навеску растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством прокаленного и промытого песка или

[1] Точка кипения 70—90°.

измельченного стекла, затем материал количественно переносят в колбу для омыления, прибавляют 20—40 мл 5% спиртовой щелочи и нагревают на водяной бане с обратным или воздушным холодильником при температуре кипения спиртовой щелочи в течение 1/2—1 часа. Затем раствор переносят в делительную воронку, прибавляют 20—30 мл бензина (или петролейного эфира) и несколько миллилитров воды (до разделения слоев). Смесь взбалтывают и производят отделение бензинового (или петролейного) слоя. Извлечение неомыляемых повторяют до получения бесцветных бензиновых вытяжек..

Оставшуюся в колбе после омыления массу промывают несколько раз бензином, а полученные бензиновые вытяжки присоединяют к основному раствору. Далее поступают, как указано выше.

Адсорбция на окиси магния или окиси алюминия и подготовка к колориметрированию

Адсорбционная колонка представляет собой суженную внизу стеклянную трубку длиной 15—20 см и диаметром 1—1,5 см. Эту трубку вставляют в резиновую пробку, предварительно подобранную к колбе для отсасывания. Последняя при помощи резиновой трубки соединяется с предохранительной склянкой, которая в свою очередь соединяется с водоструйным насосом или с иным приспособлением для создания вакуума

В нижней части адсорбционной колонки помещают небольшой слой ваты. Для наполнения адсорбционной колонки адсорбентом приготовляют кашицу из адсорбента и бензина (или петролейного эфира). Этой кашицей заполняют колонку на 4—6 см и промывают небольшими порциями бензина (или петролейного эфира). Необходимо при этом избегать образования пузырьков воздуха между кашицей и стенками трубки и следить за тем, чтобы перед началом адсорбции и во время нее верхний слой кашицы был покрыт небольшим слоем бензина (или петролейного эфира) во избежание прохождения воздуха в адсорбционную колонку[1]. Через колонку пропускают испытуемый раствор в таком количестве

[1] Колонку можно заполнять также и сухим адсорбентом, наполняя им колонку на 5—6 см и уплотняя посредством легкого встряхивания.

честве, чтобы он полностью поглотился адсорбентом, затем промывание колонки бензином (или петролейным эфиром) продолжают до тех пор, пока через колонку станет проходить бесцветная жидкость. Прошедший через колонку раствор каротина доводят в мерной колбе до определенного объема путем прибавления бензина (или петролейного эфира) и колориметрируют [1].

Колориметрирование

Колориметрирование проводят с помощью колориметра Дюбоска со стандартным раствором азобензола или бихромата калия (или колориметров других систем, включая штуфенфотометр или электрофотоколориметр).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В СУХОМ РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Первый вариант. Навеску от 1 до 20 г (в зависимости от предполагаемого содержания каротина) измельчают, обрабатывают бензином или петролейным эфиром, но без предварительной обработки спиртом. Бензиновые (или петролейные) экстракты сгущают до объема 20—30 мл и омыляют 5% спиртовой калийной щелочью. Дальнейшее определение каротина проводят, как и в случае его определения в свежих растительных объектах.

Второй вариант. Отличается от первого тем, что вначале проводится омыление исследуемого объекта с последующим переводом в бензин неомыляемой фракции.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В РАСТИТЕЛЬНЫХ СОКАХ

100 мл сока нагревают до 70—80° и прибавляют к нему 20—40 мл 5% раствора сернокислого алюминия или 5% раствора алюмокалиевых квасцов и оставляют на 1 час при комнатной температуре, затем центрифугируют, раствор сливают, а с осадком поступают так же, как при исследовании свежего растительного материала.

[1] Р. Ц. Абельсон показала, что при добавлении к петролейному эфиру 1—3% ацетона удается хорошо и быстро разделять каротиноиды на колонке с окисью алюминия.

При исследовании сока некоторых растений (например, цитрусовых) рекомендуется перед осаждением (квасцами или сернокислым алюминием) разбавлять сок водой в 5—6 раз.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В ЖИРАХ, МАСЛАХ И МАСЛЯНЫХ РАСТВОРАХ КАРОТИНА

К навеске жира или масла от 0,20 до 1 г (в зависимости от содержания каротина) прибавляют 10 мл 5% раствора калийной спиртовой щелочи и смесь омыляют при 80° в течение 1 часа на водяной бане с обратным воздушным или водяным холодильником. Омыленный раствор переносят в делительную воронку, прибавляют 20 мл воды и экстрагируют бензином или петролейным эфиром несколько раз (беря на каждую экстракцию по 25—30 мл) до тех пор, пока экстракционная жидкость перестанет окрашиваться. Бензиновые или петролейно-эфирные вытяжки соединяют и затем поступают, как указано выше.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

Навеску кристаллического каротина в количестве около 0,1 г, взятую на аналитических весах, количественно переносят в мерную колбу емкостью 250 мл при помощи 100 мл петролейного эфира; колбу с содержимым слегка подогревают на водяной бане до полного растворения кристаллов. По охлаждении объем раствора доводят до метки. Из полученного раствора отбирают 5 мл и подвергают хроматографической адсорбции, как указано.

Элюат переносят количественно в мерную колбу емкостью 100 мл, объем раствора доводят до метки растворителем. После тщательного перемешивания содержимого колбы из нее отбирают 5 мл раствора в мерную колбу емкостью 50 мл, объем раствора в колбе доводят до метки и после тщательного перемешивания раствор подвергают колориметрированию.

При пользовании стандартным раствором азобензола содержание каротина в миллиграмм-процентах (x) вычисляют по следующей формуле:

$$x = \frac{0,00235 \cdot h \cdot v \cdot 100}{h_1 \cdot a},$$

где v — объем фильтрата после хроматографической адсорбции в мл;
h — показание шкалы стандартного раствора в мм (обычно ставится на 10 мм);
h_1 — показание шкалы испытуемого раствора в мм (допустимые колебания в толщине столба исследуемого раствора от 8 до 12 мм);
a — навеска в г;
0,00235 — количество каротина в 1 мл раствора, соответствующее по окраске стандартному раствору в мг.

При пользовании стандартным раствором бихромата калия содержание каротина в миллиграмм-процентах (x_2) вычисляют по следующей формуле:

$$x_2 = \frac{0,00208 \cdot h \cdot v \cdot 100}{h_1 \cdot a},$$

где 0,00208 — количество каротина в миллиграммах в 1 мл раствора, соответствующее по окраске стандартному раствору.

Остальные обозначения те же, что и выше.

При пользовании электрофотоколориметром:

$$x_1 = \frac{K \cdot h_1 \cdot v \cdot 100}{a \cdot h},$$

где K — 1) 0,00208 — количество каротина в мг, соответствующее по окраске 1 мл стандартного раствора бихромата калия;
2) 0,00235 то же при пользовании в качестве стандарта азобензолом;
h_1 — показание шкалы реохорды для испытуемого раствора;
h — то же для стандартного раствора.

Остальные обозначения см. выше.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А В ПРОДУКТАХ, СОДЕРЖАЩИХ ОДНОВРЕМЕННО КАРОТИН

Вначале проводят определение каротина согласно приведенным указаниям. Затем определяют интенсивность синей окраски неомыляемой фракции исследуемого объекта с треххлористой сурьмой, поступая так же, как и при определении витамина А в продуктах, не содержащих каротина. Из полученного количества синих единиц вычитают синие единицы, приходящиеся на долю каротина, согласио приведенным в табл. 13 данным.

Таблица 13

Таблица перевода синих единиц каротина

Число синих единиц[1]	Содержание каротина в γ в 1 мл
0,5	5,5
0,7	10,5
1,0	16,5
1,3	24,5
1,5	29
1,8	37
2,0	45
2,3	56
2,5	64
2,8	75
3,0	83
3,3	93
3,5	101
3,8	110
4,0	117

[1] Синие единицы и едииицы CLO—условные; при смешивании 20 мг эталонного рыбьего жира с треххлористой сурьмой развивается окраска, условно принимаемая за 10 синих единиц. Эта величина соответствует 1 единице CLO.

Содержание витамина А в граммах на 1 г навески (x_1) или в интернациональных единицах на 1 г навески (x_2) вычисляют по формуле:

$$x_1 = \frac{v \cdot 20 \cdot 125(d - e)}{a \cdot 1000},$$

$$x_2 = \frac{v \cdot 20 \cdot 125(d - e)}{a \cdot 1000 \cdot 0,3},$$

где

v — объем хлороформного раствора в мл;
a — навеска в г;
d — количество синих единиц, установленное на основании колориметрирования;
e — количество синих единиц, приходящихся на долю каротина;
0,3; 20; 125 и 1000 — постоянные коэффициенты.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРОТИНА

Биологическая, провитаминная активность различных каротиноидов неодинакова: если за 100% принять транс-β-каротин, то активность других каротиноидов будет соответственно меньшей (Э. Т. Стиллер, 1952). Биологическая активность некоторых каротиноидов показана в табл. 14.

Таблица 14

Биологическая активность каротиноидов

Каротиноид	Активность в процентах к транс-β-каротину
Криптоксантин	57
Транс-α-каротин	53
Про-γ-каротин	44
Нео-β-каротин U	38
Транс-γ-каротин	28
Нео-α-каротин	16
Нео-α-каротин U	13

Спектрофотометрический метод в сочетании с методом хроматографической адсорбции дает возможность раздельного определения каротиноидов, что позволяет проводить оценку биологических свойств растительного сырья, используемого для получения препаратов, и готовых препаратов[1].

Около 0,02 г каротина (точная навеска) растворяют в хлороформе в мерной колбе емкостью 200 мл, доводят раствор хлороформом до метки и тщательно перемешивают (раствор А). 2 мл раствора А переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, доводят хлороформом до метки и тщательно перемешивают (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 465 mμ (табл. 15).

Содержание каротина в препарате в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{D \cdot v_1 \cdot v_3 \cdot 100}{a \cdot v_2 \cdot 2396},$$

где D — найденная оптическая плотность раствора Б;

a — навеска в г;

v_1 — объем первого разведения в мл (раствор А);

v_2 — количество раствора А, взятое для второго разведения в мл (раствор Б);

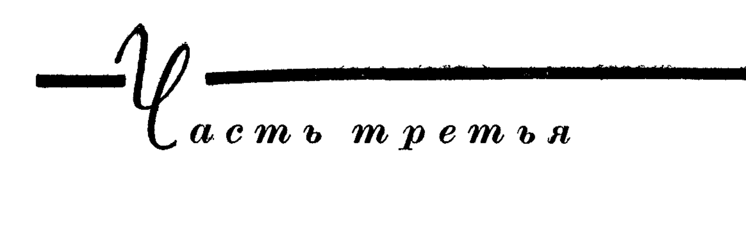
2396 — $E^{1\%}_{1\,см}$ — удельный показатель поглощения при длине волны 465 mμ.

[1] Methods of analisis. Ass. off. agric. chem. 6 ed. Washington, 1945. Применяют также в качестве растворителя петролейный эфир, Н — гексан и др.

Таблица 15

Абсорбционные максимумы изомеров β-каротина в петролейном эфире

Каротиноиды	λmμ-максимум	Автор
α-каротин	475—478; 446,5—447,5	Б. Савинов (1948)
β-каротин	480—486; 451—453,5	Он же
γ-каротин	490—495; 460—463; 400—407,5	» »
		» »
δ-каротин	484; 454; 428	» »
Нео-β-каротин V	472,5 441,5	Кноблох (1956)
Нео-β-каротин U	481; 450	Он же
Транс-β-каротин	485; 452	» »
Нео-β-каротин A	469; 437,5	» »
Нео-β-каротин B	475,5; 444,5	» »



ПРИГОТОВЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ РЕАКТИВОВ

●

Приготовление реактивов описывается в ряде методических руководств и пособий, а также в Госфармакопее СССР IX издания. В настоящем разделе описаны лишь те из них, которые являются оригинальными или предложенными авторами изложенных методов и поэтому мало известными широкому кругу химиков-аналитиков. В этом же разделе описывается также подготовка некоторых адсорбентов, применяемых в хроматографическом разделении витаминов от примесей, а также установка титрованных растворов, специфических для определения некоторых витаминов.

Основные реактивы и адсорбенты

Алюминий хлористый, 1% раствор в абсолютном этиловом спирте.

Аммиачный раствор (для определения иона Са). 13,5 г хлористого аммония и 88 мл концентрированного раствора аммиака (около 25%) смешивают в мерной колбе емкостью 250 мл и доводят водой до метки.

Аммиачный буферный раствор. В мерную колбу емкостью 1 л помещают 160 г хлористого аммония, растворяют в 600—700 мл воды, перемешивают до полного растворения, прибавляют 160 мл 27% раствора аммиака и доводят до 1 л водой.

Анилин, спиртовой раствор. Один объем свежеперегнанного над цинковой пылью анилина растворяют в 6 объемах 96% этилового спирта. Раствор должен быть бесцветным (хранят в склянках темного стекла с притертой пробкой в темноте и на холоду с предосторожностью).

Аскорбиновая кислота (стандартный раствор) (по Шварцу и Вильямсу). Приготовляют раствор, содержащий 1,5 мг аскорбиновой кислоты в 1 мл ацетатно-фосфатного реактива. Путем соответствующего разведения из него готовят серию стандартов-эталонов с содержанием от 1 до 30 γ аскорбиновой кислоты в 1 мл для построения калибровочного графика.

Ацетатно-фосфатный реактив. Приготовляют 5% раствор метафосфорной кислоты в 10%

CH_3COOH (служит для экстракции и разведения, по Шварцу и Вильямсу).

Ацетатный буферный раствор (pH=7,0). 0,1 н. раствор уксуснокислого натрия в 75% этиловом спирте доводят до pH=7,0 добавлением уксусной кислоты (применяется в полярографии токоферолов).

Ацетатный буферный раствор (pH=3,0). Приготовляют из 0,1 н. раствора уксуснокислого натрия и ледяной уксусной кислоты, проверяя pH потенциометрически.

Азобензол ч. д. а. Стандартный раствор готовят путем растворения 14,5 мг кристаллического химически чистого азобензола в 100 мл 96% этилового спирта; 1 мл такого раствора по окраске соответствует 0,00235 мг каротина в 1 мл.

Ацетилхлорид. Т. кип. 51°. Сохраняют в склянке или капельнице темного стекла с притертой пробкой.

Бензин (т. кип. 70—80°) или петролейный эфир (т. кип. 55—70°). Можно использовать также фракции, перегоняющиеся при 70—110°, однако в этом случае при сгущении экстрактов приходится пользоваться вместо водяной песчаной баней и отгонку вести в токе CO_2.

Бензол. Бензол очищают от тиофена обработкой серной кислотой до отсутствия окрашивания с изатином. Для этого к 1 л бензола в делительной воронке добавляют 200 мл концентрированной серной кислоты и взбалтывают в течение 1 часа на лабораторной мешалке, слой кислоты сливают и повторяют эту операцию еще раз. Отделенный от кислоты бензол промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции на лакмус, сушат в течение 12—18 часов над безводным сернокислым натрием и перегоняют на водяной бане при 80°.

Борная кислота (раствор) (для анализа оксидиамина и пиридоксина). 5 г борной кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Бром химически чистый, уд. вес. 3,2. Хранят с особой предосторожностью в склянке с притертой пробкой, помещенной в жестяную банку, заполненную песком.

Бромтимоловый синий (индикатор). 0,1 г хорошо растертого индикатора растворяют в 20 мл теплого спирта и по охлаждении доводят водой до 100 мл.

Бромфеноловый синий (индикатор). 0,1 г индикатора заливают в стакане 3 мл 0,005 н. раствора NaOH и затем горячей водой. После полного растворения раствор переносят в мерную колбу емкостью 250 мл и доводят водой до метки.

Бромфеноловый синий (для реакции оксилирования). 0,1 г индикатора растирают в ступке с 3 мл $^1/_{20}$ н. раствора NaOH, после полного растворения индикатора раствор доводят водой до 20 мл.

Вода хлорная. Через воду пропускают ток хлора, который получают действием перманганата на соляную кислоту. Сохраняют в темной склянке с притертой пробкой.

Гидроксиламин солянокислый (0,5 н. раствор). Растворяют 34,75 г солянокислого гидроксиламина в мерной колбе емкостью 1 л и доводят объем раствора водой до метки.

Гидроксиламин солянокислый, раствор (для реакции оксилирования). В мерную колбу емкостью 10 мл вносят 5 г $NH_2OH \cdot HCl$ и растворяют в 9 мл горячей воды. К этому раствору прибавляют 80 мл 95% этилового спирта, смешивают, вносят 2 мл раствора бромфенолового синего и общий объем раствора доводят до метки этиловым спиртом.

Гидроксиламин солянокислый (20% раствор). На технических весах отвешивают 40 г солянокислого гидроксиламина, растворяют в небольшом количестве воды в мерной колбе емкостью 200 мл и раствор доводят водой до метки.

Гидроксиламин солянокислый (0,5 н. раствор). Готовят 0,5 н. водный раствор солянокислого гидроксиламина, 25 мл которого должны быть эквивалентны 0,2 мл 0,5 н. раствора NaOH по бромфеноловому синему (употребляется в определении пропенилового эфира).

Гидроксиламин (щелочной раствор). 7,5 г гидроксиламина солянокислого растворяют в 100 мл 1 н. раствора NaOH (готовится перед употреблением).

Декальсо (по способу О. С. Шерман). 20,5 г сернокислого алюминия растворяют в 120 мл дистиллированной воды, к раствору добавляют при непрерывном взбалтывании 30 мл 60% водного раствора едкого натра. Выпадает осадок, растворяющийся по мере прибавления

щелочи. По растворении осадка к смеси приливают отвешенные 36 г 60—64% раствора кремнекислого натрия. Содержимое колбы быстро и тщательно перемешивают; образуется студенистая масса, которую оставляют на 24 часа. Полученную массу отмывают водой на фарфоровой воронке от щелочи до нейтральной реакции по фенолфталеину. В качестве фильтрующего материала рекомендуется применять ткань типа бельтинг.

Промытый от щелочи остаток сушат при температуре 60—70°, пока вес его не будет составлять около 30 г, переносят в стакан или чашку, растворяют в 200 мл 80% раствора соляной кислоты и оставляют на 40—48 часов. За это время образуется гель, который постепенно укрепляется, затем начинает сморщиваться и отрываться от стенок. Такой гель переносят в фарфоровую чашку и сушат при температуре 100—110°, время от времени отмывая концентрирующуюся в чашке соляную кислоту водой до исчезновения желтой окраски. Отмытый от желтизны осадок, который к этому времени сильно уменьшается в объеме, сушат в течение 2 часов при 130—140°, после чего промывают 1—2 раза водой и сушат при 100—105° в течение 1—1½ часов. Весь процесс сушки длится 14—16 часов.

Полученные в результате сушки желтоватого цвета блестящие зерна осторожно измельчают в ступке с таким расчетом, чтобы около 60% их просеивалось через сито с отверстиями диаметром 0,25 мм и 40% через сито с отверстиями 0,5 мм. Выход продукта 8—10 г.

Полученный адсорбент дважды обрабатывают при нагревании с 8—10 объемами 3% CH_3COOH 15 минут. Обработку повторяют 4 раза. Между 3-м и 4-м прибавлением кислоты адсорбент обрабатывают четырьмя объемами 25% хлористого калия 20 минут, промывают водой до исчезновения реакции на хлор, фильтруют, высушивают и сохраняют в склянке с притертой пробкой[1].

[1] Другой способ получения декальсо предложен Международной комиссией по химии зерна: 588 мл раствора кремнекислого натрия (уд. вес 1,188 при 20°) разводят 463 мл воды При непрерывном помешивании прибавляют 485 мл 20% раствора азотнокислого алюминия. Образуется желатинообразный осадок. К нему добавляют 750 мл воды и тщательно размешивают. Оставляют на 48 часов, белый осадок отделяют, нитраты отмывают водой, продукт высушивают при 80° и измельчают

Диазореактив (для определения тиамина). Раствор I: 0,159 г п-аминоацетофенона растворяют в 2,25 мл концентрированной HCl (уд. вес 1,19) и доводят водой до объема 25 мл. Раствор сохраняют в темноте. Устойчив в течение 6 месяцев.

Раствор II: 22,5 г $NaNO_2$ растворяют в 500 мл воды. Раствор сохраняют в темноте. Устойчив в течение 1 месяца.

Перед употреблением смешивают при охлаждении в бане со льдом или снегом растворы I и II в отношении 1 : 1, встряхивают (при охлаждении) в течение 10 минут, к полученному раствору добавляют 4 части второго раствора, смесь взбалтывают и оставляют на льду на 20 минут.

Щелочной раствор. 40 г NaOH растворяют в 600 мл воды, добавляют 28,8 г $NaHCO_3$ и доводят водой до 1 л.

Диатомит (адсорбент). Диатомит обрабатывают концентрированной соляной кислотой при настаивании в течение суток. После этого кислоту сливают и диатомит заливают двунормальным раствором соляной кислоты и кипятят с обратным холодильником в течение 1 часа. Затем кислоту сливают и диатомит промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод. После отсасывания воды на воронке Бюхнера диатомит промывают спиртом и бензолом и сушат на открытом воздухе или в термостате при 50°. Срок годности диатомита без повторной активации не более 6 месяцев.

Дигитонин (1% раствор). 1 г дигитонина растворяют при нагревании на водяной бане при 60—70° в 80 мл 96% этилового спирта в мерной колбе емкостью 100 мл. После полного растворения навески колбу охлаждают до 20° и доводят тем же спиртом при той же температуре до метки. Содержимое колбы тщательно перемешивают.

2,4-динитрофенилгидразин (2% раствор) в смеси, состоящей из 1 ч. концентрированной H_2SO_4 и 3 ч. воды.

2,4-динитрофенол (раствор). 0,1 г 2,4-динитрофенола растворяют в 100 мл 95% этилового спирта.

α-α'-дипиридил (0,5% раствор). 0,5 г α-α'дипиридила растворяют в абсолютном этиловом спирте в мерной

колбе емкостью 100 мл и доводят до метки спиртом. Раствор сохраняют в склянке темного стекла с притертой пробкой. Годен в течение не более 1 месяца.

Дифениламин (раствор). 0,5 г дифениламина растворяют в смеси 100 мл концентрированной H_2SO_4 (уд. вес 1,84) и 20 мл воды.

Дифенилкарбазон (1% раствор). 1 г дифенилкарбазона растворяют в мерной колбе емкостью 100 мл в этиловом спирте и доводят спиртом до метки.

2,6-дихлорфенолиндофенол (по Шварцу и Вильямсу). 100 г натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола растворяют в 50 мл воды.

2,6-дихлорфенолиндофенол (натриевая соль), 0,001 н. раствор (приготовление и установка титра по ГОСТ 7047-55). 0,2 г соли растворяют в 600 мл воды при энергичном взбалтывании[1]. Раствор фильтруют и доводят водой до 1 л.

Установку титра раствора производят по одному из следующих методов:

а). По соли Мора. В коническую колбу наливают 10 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, а в микробюретку — 0,01 н. раствор соли Мора; к раствору 2,6-дихлорфенолиндофенола прибавляют 5 мл насыщенного раствора щавелевокислого аммония или натрия и титруют до изменения синей окраски раствора в соломенно-желтую (появление бурой окраски указывает на непригодность раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола).

Поправку (F) к титру раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола вычисляют по формуле:

$$F = \frac{v_1 \cdot v_2}{v_3},$$

где v_1 — количество соли Мора, пошедшее на титрование 10 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, в мл;

v_2 — количество раствора $KMnO_4$, пошедшее на титрование 10 мл соли Мора, в мл;

v_3 — количество раствора $KMnO_4$, пошедшее на титрование 10 мл точного 0,1 н. раствора щавелевокислого аммония или натрия, в мл.

[1] Вместо воды целесообразно употреблять буферную смесь (однозамещенный фосфат калия и двузамещенный фосфат натрия, pH=7,0).

1 мл точного 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты.

б). По йодату[1]. Несколько кристалликов аскорбиновой кислоты растворяют в 50 мл 2% раствора H_2SO_4. Из полученного раствора отбирают 5 мл для титрования рабочим (приблизительно 0,001 н.) раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола и 5 мл для титрования точным 0,001 н. раствором KJO_3.

Титрование раствором KJO_3 ведут в присутствии нескольких кристаллов (1—2 мг) KJ и 2—3 капель 1% раствора крахмала до появления голубого окрашивания; титрование раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола производят до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 3 минут.

Титрование удобно производить в фарфоровой чашке. Расчет титра раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола по аскорбиновой кислоте (x) производят по следующей формуле, исходя из того, что 1 мл 0,001 н. раствора йода, а следовательно, и KJO_3 эквивалентен 0,08806 мг аскорбиновой кислоты.

$$x = \frac{0,03806 \cdot v_1}{v_2},$$

где v_1 — количество 0,001 н раствора KJO_3, пошедшее на титрование, в мл;

v_2 — количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшее на титрование, в мл.

Таким образом узнают, какому количеству аскорбиновой кислоты в миллиграммах соответствует 1 мл приготовленного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.

2,6-дихлорхинонхлоримид. 20 мг перекристаллизованного 2,6-дихлорхинонхлоримида растворяют в 50 мл изопропилового спирта. Раствор хранят в склянке темного стекла с притертой пробкой на холоду. (Если нужно, реактив вначале перекристаллизовывают: для этого 1 г реактива растворяют в 50 мл ацетона и 200 мл воды. Выпавшие кристаллы отфильтровывают, высушивают на воздухе и сохраняют в темном месте.)

Желатина (раствор) для полярографии. 1 или 0,1 г желатины растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

[1] Метод предложен С М Прокошевым, Институт биохимии имени Баха АН СССР

Желатина (раствор) для определения фолиевой кислоты. 0,5 г желатины и 0,1 г бензойной кислоты растворяют в 100 мл воды.

Железоаммониевые квасцы (индикатор при объемном определении галоидов). 30 г железоаммониевых квасцов $[FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12\ H_2O]$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды. К раствору после фильтрования добавляют разбавленной (1 : 1) азотной кислоты до перехода коричневой окраски раствора в желтовато-зеленую.

Железо сернокислое окисное (5% раствор). 50 г $Fe_2(SO_4)_3$ растворяют в воде, добавляют 200 г концентрированной H_2SO_4 (уд. вес 1,84), раствор доводят водой до 1 л.

Железотартратный реактив. 1,25 г сегнетовой соли и 0,25 г безводного $FeSO_4$ (или эквивалентное количество $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$) растворяют в 250 мл дистиллированной воды. Реактив сохраняется на холоду не более 48 часов.

Железо хлорное (1 и 2% водный раствор). 1 или 2 г $FeCl_3$ растворяют в мерной колбе емкостью 100 мл в воде и раствор доводят водой до метки.

Железо хлорное (0,25% спиртовой раствор). 0,25 г сухого препарата хлорного железа растворяют в абсолютном этиловом спирте в мерной колбе емкостью 100 мл, объем раствора доводят до метки спиртом. Раствор сохраняют в темноте (применяется в определении токоферолов).

Индигокармин. 1 г индигокармина растирают в ступке и растворяют в 50 мл концентрированной H_2SO_4. Полученный раствор доводят до 1 л водой, выдерживают в темном месте в течение суток и фильтруют.

Йод (раствор) для определения нитрооксипиридина. 25,4 г кристаллического йода смешивают в склянке темного стекла с 30 г йодистого калия, прибавляют немного воды и оставляют на 2 часа. Фильтруют через вату в мерную колбу емкостью 1 л, тщательно смывая содержимое склянки водой. Раствор доводят водой до метки.

Поправку к титру раствора ($к$) устанавливают следующим образом: 5 мл полученного раствора переносят в коническую колбу, добавляют 20—30 мл воды и титруют точным 0,1 н. раствором $Na_2S_2O_3$, добавляя в конце титрования 2 мл раствора крахмала.

Расчет производят по формуле:

$$k = \frac{v}{2 \cdot v_1},$$

где v — количество точного 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшее на титрование, в мл;

v_1 — количество раствора йода, взятое на титрование, в мл.

Йод (0,1 н. раствор). 12,692 г свежевозогнанного йода растворяют в 20 мл водного раствора йодистого калия, содержащего 20 г KJ в указанном объеме. После полного растворения йода раствор переводят в мерную колбу емкостью 1 л и содержимое колбы доводят водой до метки. Титр раствора устанавливают по общим правилам объемного анализа.

Йодокрахмальная бумага. В ступке тщательно растирают 2 г крахмала, перемешивают с 10 мл воды до получения однородной кашицы и медленно вносят в 500 мл кипящей воды. Кипячение продолжают еще 1—2 минуты. Раствор охлаждают и добавляют к нему 2 г йодистого калия. Фильтровальную бумагу смачивают приготовленным раствором йодистого калия в крахмальном клейстере и сушат в помещении, защищенном от действия паров, газов, влаги, пыли и света. Высушенную бумагу нарезают полосками и хранят в склянке темного стекла с притертой пробкой.

Йодистоводородная кислота (уд. вес 1,68—1,7), применяемая в анализе, должна быть бесцветной или с очень слабо желтым оттенком. Для регенерации кислоты к ней добавляют небольшое количество красного фосфора и перегоняют из колбы Вюрца при пропускании умеренного тока азота или углекислоты, собирая фракцию, кипящую при 127°. Хранят в темной склянке с притертой пробкой на холоду.

Калий двухромовокислый (для определения спирта). 19 г дважды перекристаллизованного х. ч. $K_2Cr_2O_7$ растворяют в 1 л дистиллированной воды. 1 мл этого раствора соответствует 1 мл этилового спирта в 1 мл испытуемого раствора.

Калий двухромовокислый (стандарт для определения каротина). Стандартный раствор готовят

путем растворения 300 мг трижды перекристаллизованного бихромата калия в 1 л воды; 1 мл такого раствора по окраске соответствует 0,00208 мг каротина в 1 мл.

Кали едкое (0,5 н. раствор). Растворяют 28 г KOH в воде в мерной колбе емкостью 1 л и доводят объем раствора до метки. Титр его устанавливают по янтарной кислоте.

Кали едкое (спиртовой раствор для реакции ацетилирования). 35 г кристаллического KOH промывают 3—4 раза этиловым спиртом, растворяют в 1 л этилового спирта, осадку дают отстояться и фильтруют через стеклянную вату до полной прозрачности.

Кали едкое (20% раствор). 20 г KOH растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе емкостью 100 мл, объем раствора доводят до метки водой.

Кали едкое (10% спиртовой раствор).

Калий йодистый (10% раствор в воде).

Калий йодноватокислый (0,1 н. раствор). Растворяют точно отвешенные 3,5670 г химически чистой йодноватокислого калия в воде, доводят объем водой до 1 л и получают 0,1 н. раствор, из которого по мере надобности путем разведения получают растворы нужной нормальности (0,01 н., 0,001 н.). При отсутствии химически чистого йодноватокислого калия применяют перекристаллизованный и высушенный при 105° до постоянного веса реактив.

Калий марганцовокислый (0,1 н. раствор для макрометода Бертрана). Приготовление и установка титра см. Н. А. Шилов, Объемный анализ, ВХТИ, 1933.

Калий марганцовокислый (0,01574 н. раствор для микрометода Бертрана). 0,5 г $KMnO_4$ растворяют в воде и доводят до 1 л водой. 1 мл полученного раствора должен соответствовать 1 мг меди.

Калий марганцовокислый (для окисления примеси в рибофлавине). 4 г $KMnO_4$ растворяют в воде, объем раствора доводят до 100 мл. Раствор приготовляют заново каждые 2 недели.

Комплексона III 0,1 М. раствор. Растворяют 37,23 г комплексона в воде в мерной колбе емкостью 1 л и доводят водой до метки. Титр раствора устойчив неограниченное время.

Крахмал (раствор). 0,5 г растворимого крахмала растирают в ступке с 5 мл воды до получения однородной кашицы; смесь медленно вливают при постоянном помешивании в 100 мл кипящей воды и кипятят еще 2—3 минуты до получения прозрачной или слабо опалесцирующей жидкости. Раствор употребляют профильтрованным. Сохраняют на холоду не более 2—3 дней.

Крахмал с йодистым калием (раствор). 0,5 г йодистого калия растворяют в 100 мл свежеприготовленного раствора крахмала. Раствор пригоден в течение 24 часов.

Кристаллический фиолетовый, гексаметил-п-розанилин хлорид. 0,1 г индикатора растворяют в безводной уксусной кислоте и доводят этой кислотой до 100 мл. (Применяется для неводного титрования.)

Ликопин (для проверки адсорбента при определении каротина). Получают бензиновый экстракт из свежих или консервированных томатов таким образом, как указано при определении каротина в свежих растительных веществах. Затем бензиновый экстракт пропускают через адсорбционную колонку, наполненную окисью магния, просушенной при 100—105°, и колонку промывают бензином до тех пор, пока проходящий через колонку бензин перестанет окрашиваться. После этого вводят через верхнее отверстие колонки шпатель, извлекают часть адсорбента, содержащего розовое кольцо. Розовый пигмент (ликопин) из адсорбента извлекают бензином с примесью 3% спирта. Из бензинового экстракта спирт отмывают водой, а остаток влаги удаляют с помощью сернокислого натрия, поступая так же, как и при просушивании бензиновых экстрактов каротина.

Лимонно-борный реактив Раствор I: 10 г лимонной кислоты, высушенной при 60° в течение 2 часов, растворяют в 100 мл сухого ацетона.

Раствор II: 0,8 г борной кислоты растворяют в 100 мл сухого ацетона.

Оба раствора пересыщены и перед употреблением их фильтруют.

Непосредственно перед употреблением смешивают 4 мл раствора с 4 мл раствора II (на одно определение).

Магния окись (адсорбент). Химически чистый продажный препарат сушат в сушильном шкафу при 100—105° до постоянного веса. Адсорбционная способность окиси магния проверяется пропусканием через нее бензинового раствора ликопина и каротина. Адсорбент

пригоден, если при пропускании через него бензинового раствора каротина потеря составляет не более 15% и наряду с этим задерживается ликопин в виде розового кольца. Испытывают адсорбционную способность адсорбента при различном его увлажнении и устанавливают процент влажности, при котором адсорбент удовлетворяет указанному выше требованию. Увлажнение адсорбента проводится в эксикаторе над водой, влажность проверяют путем высушивания в сушильном шкафу при 105° до постоянного веса.

Примечание Увлажнение проводится в том случае, когда сухой адсорбент не удовлетворяет предъявленным требованиям.

Адсорбент следует хранить в стеклянной банке; пробка должна быть залита парафином.

При расчете результатов анализа необходимо принимать во внимание процент потери каротина, который дает данный адсорбент.

Определение качества адсорбента

а) **Определение потери каротина при адсорбции.** Навеску кристаллического каротина 0,05 г растворяют в 50 мл бензина. Путем последовательного разведения этого раствора получают бензиновый раствор с примерным содержанием 0,01 мг каротина в 1 мл.

3—5 мл этого раствора пропускают через колонку с адсорбентом. В прошедшем через колонку растворе *(а)* определяют каротин колориметрированием. Затем раствор пропускают вторично через колонку, наполненную свежим адсорбентом, снова определяют каротин в прошедшем через колонку растворе *(б)*.

Потерю каротина при адсорбции вычисляют по разности между содержанием каротина в растворах *а* и *б*.

б) **Определение способности адсорбента задерживать ликопин.** В наполненную адсорбéнтом колонку наливают 1 мл раствора ликопина в бензине. Раствор ликопина должен быть приготовлен таким образом, чтобы по окраске он соответствовал раствору азобензола, полученному путем растворения 14,5 мг кристаллического азобензола в 100 мл 96% спирта. На колонке должно оставаться прочно удерживающееся при промывании колонки бензином розовое кольцо (прошедший через колонку при ее промывании бензин должен быть бесцветным; рассматривать собранный в пробирке бензин следует в слое около 15 см). Затем в колонку вносят 2 мл бензинового раствора каротина, содержащего примерно 0,01—0,005 мг каротина в 1 мл. При промывании колонки бензином каротин должен проходить через колонку, не увлекая за собой розового (ликопинового) кольца.

Майера реактив, 1,358 г сулемы растворяют в 60 мл воды, приливают раствор, содержащий 5 г йодистого калия в 10 мл воды, и доводят водой до 100 мл.

Метиловый синий (раствор). 1 г метиленовой синей растворяют в 100 мл воды, тщательно взбалтывают и отфильтровывают от нерастворившихся примесей.

Метиловый красный (индикатор). 0,1 г индикатора растворяют в 100 мл 60% этилового спирта. Переход окраски к желтому в пределах pH=4,2—6,2.

Метиловый оранжевый (индикатор). 0,1 г тонко растертого индикатора растворяют в воде в мерной колбе емкостью 100 мл и доводят водой до метки.

Мора соль (двойная сернокислая соль закиси железа и аммония, $FeSO_4\,(NH_4)_2SO_4 \cdot 6\,H_2O$, 0,01 н. раствор). Навеску 3,92 г соли растворяют в 1 л 0,02 н. раствора H_2SO_4. Раствор соли Мора хранят в склянке темного стекла. Титр его проверяют каждые 3—4 недели. Установку титра соли Мора ведут по титрованному 0,01 н. раствору $KMnO_4$.

Мочевина — 8% водный раствор.

Натрия гидросульфит (раствор). Растворяют 1 г гидросульфита натрия в 40 мл 2% раствора двууглекислого натрия. Раствор сохраняют в бане со льдом не более 4 часов.

Натрия нитрит (раствор). 2 г нитрита натрия растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе емкостью 100 мл и доводят объем до метки водой. Раствор готовят свежий через 2—3 дня, сохраняют в холодильнике и доводят до комнатной температуры перед употреблением (применяется в определении токоферолов).

Натрия нитрит (0,1 н. раствор) и установка его титра. Навеску $NaNO_2$ около 7 г растворяют в воде в мерной колбе емкостью 1 л и доводят до метки водой. Поправку к титру раствора устанавливают по сульфаниловой кислоте, которую предварительно очищают следующим образом: 100 г сульфаниловой кислоты

дважды перекристаллизовывают из кипящей воды и сушат в сушильном шкафу при 120°. После сушки в течение 2 часов кислоту растирают в ступке и вновь высушивают при 120° до постоянного веса.

Для приготовления 0,1 М раствора отвешивают около 8,7 г высушенной сульфаниловой кислоты (точная навеска), прибавляют 10 мл воды и 4,5 г $NaHCO_3$, размешивают стеклянной палочкой до полного растворения кислоты, раствор количественно переносят в мерную колбу емкостью 500 мл, доводят до метки водой и хорошо перемешивают.

Поправку (к) к приготовленному 0,1 М раствору сульфаниловой кислоты устанавливают по формуле:

$$k = \frac{A}{8,659},$$

где A — навеска кислоты в г;
8,659 — эквивалент сульфаниловой кислоты.

После определения поправки к раствору сульфаниловой кислоты устанавливают поправку к раствору нитрита натрия.

Для этого в толстостенный стакан емкостью 500 мл вливают 25 мл 0,1 М раствора сульфаниловой кислоты, 175 мл воды и 20 мл HCl (уд. вес 1,19). Раствор охлаждают (температура раствора должна быть не выше 10°) и титруют приготовленным раствором нитрита натрия, прибавляя его медленно, небольшими порциями, при постоянном помешивании стеклянной палочкой содержимого стакана. Конец реакции устанавливают следующим образом: после прибавления очередной порции раствора нитрита натрия палочкой наносят каплю смеси из стакана на полоску йодокрахмальной бумаги. Если в центре капли не появится синее пятно, прибавляют новую порцию раствора нитрита натрия. Если же пятно появилось, наносят вторую, затем третью каплю смеси на бумагу, и, если все они дают побурение на бумаге, раствор оставляют стоять в течение 5 минут. Вторичное появление пятна через 5 минут служит признаком окончания титрования.

Первое титрование считается ориентировочным. Испытание на йодокрахмальной бумаге производят после прибавления каждой новой порции нитрита натрия. При втором титровании прибавляют раствор нитрита натрия в количестве на 0,5—1,0 мл меньше, чем при первом, и продолжают титрование, добавляя раствор нитрита натрия по 1 капле, проверяя после добавления каждой капли конец реакции на йодокрахмальной бумаге.

Титрование повторяют 2—3 раза и останавливаются при схождении параллельных результатов.

Поправку к раствору нитрита натрия вычисляют по формуле:

$$k = \frac{25}{a},$$

где a — количество раствора нитрита натрия, пошедшее на титрование, в мл.

Установка титра нитрита натрия по белому стрептоциду[1]

Титр раствора нитрита натрия можно устанавливать по белому стрептоциду, который предварительно очищают следующим образом: навеску стрептоцида растворяют в восьмикратном объеме кипящей воды, куда прибавляют 1 г активированного угля. Раствор фильтруют. Выпавшие при охлаждении кристаллы отделяют и сушат до постоянного веса при 100°.

Точную навеску белого высушенного стрептоцида в количестве 8,61 г растворяют в 500 мл 0,5 н. раствора HCl. В коническую колбу отбирают 20 мл раствора стрептоцида, добавляют 150 мл воды, 1,5 мл HCl (уд. вес 1,19) и 1 мл 10% раствора KBr, охлаждают до 5—10° и титруют приготовленным раствором нитрита натрия. При титровании раствор нитрита прибавляют небольшими порциями, проверяя каждый раз конец реакции по йодокрахмальной бумаге. Концом титрования считают тот момент, когда спустя 5 минут после прибавления последней порции раствора нитрита натрия капля раствора оставляет на йодокрахмальной бумаге пятно.

При повторном титровании, зная примерный расход нитрита натрия, бо́льшую часть его приливают сразу, но на 0,5—1 мл меньше, чем требуется, добавляя последние порции раствора по каплям и контролируя конец реакции по йодокрахмальной бумаге, после прибавления каждой капли.

[1] По способу, применяемому на кафедре красящих веществ Ленинградского химико-технологического института.

Поправку к раствору рассчитывают по формуле:

$$k = \frac{20}{a},$$

где a — количество раствора нитрита, пошедшее на титрование, в мл.

Натрия сернистого раствор. Одну весовую часть NaOH растворяют в 8 частях воды. 4 части полученного раствора насыщают сероводородом до тех пор, пока в закрытом сосуде запах сероводорода будет стойким в течение 30 минут. Затем добавляют оставшиеся 5 частей раствора NaOH и 18 частей глицерина, смесь оставляют в закупоренных склянках на 3—5 дней до осаждения нерастворимых сульфидов и раствор фильтруют через смоченную водой вату. Сохраняют в небольших, хорошо закупоренных наполненных доверху склянках в прохладном и защищенном от света месте.

Смесь из 5 мл воды, 3 капель разведенной уксусной кислоты и 3 капель реактива не должна изменяться в течение 10 минут.

Натрий серноватокислый (гипосульфит натрия), 0,1 н. раствор. 24,82 г $Na_2S_2O_3$ растворяют в свежепрокипяченной дистиллированной воде и доводят объем до 1 л. Титр раствора устанавливают по 0,1 н. раствору $KMnO_4$, который проверяют по точной навеске щавелевокислого аммония или натрия, по общим правилам объемного анализа. Для приготовления 0,002 н. раствора производят соответствующее разведение 0,1 н. раствора.

Примечание. Титр 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$ следует устанавливать спустя 5—7 суток после его приготовления.

Натрий уксуснокислый (2,5 М раствор). 340 г соли растворяют в 1 л воды.

Натрий сернокислый, кристаллический прокаливают для обезвоживания, а безводный подсушивают при 105—110°.

N-1-нафтилэтилендиамин-дигидрохлорид (0,1% раствор). 0,1 г соли растворяют в воде в мерной колбе емкостью 100 мл и доводят водой раствор до метки.

Нафтол-альфа. 5 г α-нафтола растворяют в 50 мл 96% этилового спирта. Реактив сохраняют в темной склянке в течение не более 7 дней.

Несслера реактив. 15 г двуйодистой ртути смешивают с 10 г йодистого калия и 40 г едкого кали и растворяют в 50 мл воды. Реактив оставляют на 2—3 дня в темноте, после чего его декантируют от осадка и сохраняют в склянке с притертой пробкой темного стекла.

Никотинамида стандартный раствор. Содержит 0,2 мг в 1 мл. Приготовляется так же, как раствор никотиновой кислоты.

Никотиновая кислота (стандартный раствор). 20 мг чистой никотиновой кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды. 1 мл раствора содержит 0,2 мг никотиновой кислоты. Дальнейшую обработку раствора ведут параллельно с испытуемым раствором.

п-нитроанилин диазотированный. 14 г п-нитроанилина (0,1 моля) растворяют при нагревании в 60 мл разведенной (1 : 1) HCl. Раствор выливают на находящиеся в небольшом толстостенном стакане 80 г льда. Диазотирование ведут при 5—10°, сразу приливая (при энергичном размешивании) раствор 8 г азотистокислого натрия в 20 мл воды. После прекращения вспенивания раствор соли диазония приливают при помешивании к 400 мл 4 н. раствора NaOH, подогретого до 40—50°.

При охлаждении раствора из него выделяются красивые золотисто-желтые листочки.

Через несколько часов соль отфильтровывают на бюхнеровской воронке и промывают 5 раз насыщенным водным раствором NaCl, используя каждый раз по 50 мл раствора. Высушенный на глиняной тарелке препарат сохраняется длительное время. Для освобождения его от примесей NaCl препарат растворяют в небольшом количестве 60% этилового спирта и фильтруют; фильтрат упаривают досуха на кипящей водяной бане. Выход 18 г.

Препарат растворяют в 60% уксусной кислоте для переведения в активную форму. Непосредственно перед анализом приготовляют 0,1% раствор препарата в 60% уксусной кислоте и после фильтрования употребляют для анализа.

Окислительная смесь (для определения тиамина). Перед анализом непосредственно смешивают 4 мл 1% водного раствора красной кровяной соли (перекристаллизованной из воды) с 96 мл 15% водного раствора едкого натра.

Олово хлористое (раствор). Растворяют 10 г $SnCl_2$ в 25 мл концентрированной HCl и сохраняют в темной склянке с притертой пробкой при комнатной температуре. Из этого раствора перед анализом приготовляют рабочий раствор, доводя 1 мл раствора до 500 мл дистиллированной водой.

Олово хлористое (раствор) для определения нитрооксипиридина. Навеску хлористого олова в количестве 28,3 г растворяют в 30 мл концентрированной HCl (уд. вес 1,19) и доводят до объема водой, насыщенной углекислотой. Раствор хранят в склянке с притертой пробкой, заполненной углекислотой.

Пантотенат кальция (стандартный раствор). Готовят раствор из предварительно высушенного в вакуум-эксикаторе над серной кислотой в течение 24 часов 100% пантотената кальция с содержанием 1 мг пантотената в 1 мл; для этого 100 мг пантотената растворяют в воде в мерной колбе емкостью 100 мл и доводят водой до метки. Раствор устойчив при хранении в темноте и на холоду в течение 2 недель.

Пара-аминобензойная кислота: растворяют при нагревании п-аминобензойную кислоту в спирте. К кипящему раствору добавляют немного активированного угля и перемешивают. Горячий раствор фильтруют и охлаждают. Выпавшие кристаллы отсасывают на бюхнеровской воронке и высушивают при комнатной температуре на фильтре.

Если температура плавления кристаллов ниже 187—188°, перекристаллизацию повторяют.

β-пиколина эталон. 4,75 г β-пиколина, очищенного тройной перекристаллизацией комплекса с медным купоросом, приливают к 0,25 г 2,6-лутидина, очищенного четырехкратной перекристаллизацией. Бюкс, в котором взвешивали β-пиколин, дважды ополаскивают порциями по 3 мл абсолютного серного эфира и добавляют к основной смеси. Эфир выпаривают на слегка нагретой водяной бане. Получают эталон с содержанием 95% β-пиколина и 5% 2,6-лутидина.

Рибофлавин (стандартный раствор). Точную навеску рибофлавина в количестве 10 мг растворяют в воде в мерной колбе емкостью 250 мл. Этот раствор содержит 40 γ рибофлавина в 1 мл. Раствор стоек на холоду при хранении его в темноте в течение 1 месяца. Для определения каждый раз готовят рабочий раствор. Для этого 1 мл стандартного раствора доводят в мерной колбе емкостью 100 мл водой до метки. В 1 мл рабочего раствора содержится 0,4 γ рибофлавина.

Роданбромидный раствор. 4 мл брома вносят в 100 мл дистиллированной воды, энергично встряхивают и отстоявшийся раствор декантируют. К охлажденной на льду бромной воде, взятой в нужном для анализа количестве, прибавляют по каплям 10% раствор роданистого аммония или калия до светло-желтого окрашивания, затем 1% раствор до полного обесцвечивания. К обесцвеченному раствору добавляют небольшими порциями 20—50 мг углекислого кальция до прекращения выделения CO_2 и образования мути. Раствор фильтруют в склянку темного стекла с притертой пробкой и сохраняют на холоду. Годен в день приготовления.

Роданбромидный раствор (по В. М. Иосиковой). В коническую колбу отбирают 10 мл н. раствора KCNS или NH_4CNS, добавляют 1 г бромистого калия, после полного растворения его прибавляют 1 мл разведенной 1 : 1 HCl и из автоматической пипетки прибавляют по каплям 2 мл брома (уд. в. 3,2) при постоянном помешивании содержимого колбы. Приготовленный раствор используют немедленно, не давая ему охладиться.

Ртути ацетата 4% раствор. Растворяют 40 г ацетата ртути в абсолютном метаноле, объем раствора доводят до 1 л. Для стабилизации раствора к нему добавляют 3—8 капель ледяной уксусной кислоты. Перед использованием раствор фильтруют.

Свинец азотнокислый. 50 г $Pb(NO_3)_2$ растворяют в 100 мл воды.

Силикагель (адсорбент). Силикагель, ГОСТ 7956-54, крупнопористый, марки МФК или ШФК, измельчают на шаровой мельнице и просеивают через сито с размером ячеек 0,15—0,20 мм. Каждую полученную фракцию обрабатывают 6 н. раствором HCl. Кислота должна полностью покрывать силикагель. Обработка длится 4 часа при кипячении с последующей отмывкой дистиллированной водой до отсутствия реакции промывных вод на ионы хлора. Силикагель высушивают при 115° в сушильном шкафу, после чего прокаливают в муфельной печи при 650—700° в течение $2^1/_2$—3 часов. Затем печь выключают и силикагель постепенно охлаждают до

150°. Силикагель пересыпают в банки с притертыми пробками.

Соляно-фосфатный реактив. Смешивают 3 ч. концентрированной HCl (уд. вес 1,19) с 2 ч. 85% H_3PO_4.

Спирты для извлечения тиохрома (изобутиловый, изоамиловый, бутиловый). В случае наличия флуоресценции спирты перед употреблением подвергают очистке: к 1 л спирта добавляют 15—20 г активированного угля, встряхивают 15 минут, оставляют на сутки, повторяя несколько раз встряхивание. Декантируют, фильтруют, высушивают над хлористым кальцием и перегоняют при соответствующей температуре. Перегонку изобутилового, изоамилового и бутилового спирта ведут на глицериновой или песчаной бане, а этилового — на водяной бане.

Сурьма треххлористая (раствор). Продажную треххлористую сурьму промывают хлороформом, пока не будет стекать прозрачный и бесцветный раствор, и высушивают в эксикаторе над серной кислотой в течение 1—2 суток. Насыщенный раствор треххлористой сурьмы в очищенном хлороформе приготовляют при 20°.

Тальк. Продажный тальк активируют следующим образом: кипятят 100 г талька 4 часа с 500 мл 2 н. раствора HCl при постоянном перемешивании мешалкой. Соляную кислоту сливают, адсорбент промывают водой на бюхнеровской воронке при разрежении до нейтральной реакции, сушат 6—8 часов при 100—105° и сохраняют в склянках с притертыми пробками. В случае увлажнения адсорбента при хранении его снова нужно подсушить при 100—105°. Для проверки качества адсорбента после пропускания через него раствора витамина D_2 колонку проявляют при слабом разрежении горячим 50% раствором треххлористой сурьмы: в верхнем слое должно появиться красно-бурое кольцо фотодериватов.

Тиамин (стандартный раствор). 100 мг (точная навеска) кристаллического тиаминхлорида, предварительно высушенного при 100—105° в течение 2 часов, растворяют в мерной колбе емкостью 1 л в воде и доводят до метки водой. В 1 мл стандартного раствора содержится 100 γ тиамина. Раствор устойчив в течение 1 месяца при хранении на холоду в темной склянке с притертой пробкой.

Тиамин (стандартный рабочий раствор). 1 мл стандартного раствора тиамина доводят в мерной колбе емкостью 100 мл водой до метки. В 1 мл раствора содержится 1 γ тиамина. Раствор пригоден только в день анализа.

Тимолфталеин (индикатор). 0,1 г индикатора растворяют в 100 мл 96% этилового спирта. Переход окраски от бесцветного к синему в пределах pH=9,3—10,5.

Тиомочевина. 1% раствор тиомочевины в 5% метафосфорной кислоте.

Углекислый газ или азот для очистки от примесей пропускают через поглотители с водой, щелочным раствором пирогаллола и серной кислотой.

Фелинга I раствор (для метода Бертрана). 40 г перекристаллизованного медного купороса растворяют в воде и доводят водой до 1 л.

Фелинга II раствор (для метода Бертрана). 200 г сегнетовой соли растворяют в 400—500 мл воды. 150 г химически чистого едкого натра растворяют в 200—300 мл воды. Оба раствора смешивают и доводят водой до 1 л.

Фелинга I раствор (для метода Лейна и Эйнона). 69,28 г химически чистого перекристаллизованного медного купороса ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) растворяют в воде в мерной колбе емкостью 1 л и доводят водой до метки.

Фелинга II раствор (для метода Лейна и Эйнона). 340 химически чистой сегнетовой соли растворяют при слабом нагревании в 400—500 мл воды. Отдельно растворяют 100 г KOH в 200—300 мл воды. После полного растворения растворы смешивают, доводят водой в мерной колбе емкостью 1 л до метки и фильтруют.

о-фенантролина раствор. Растворяют 0,5 г ортофенантролина в абсолютном этиловом спирте в мерной колбе емкостью 100 мл и доводят спиртом до метки. Раствор сохраняют в темной склянке с притертой пробкой. Срок годности раствора не более 1 месяца.

Фенолфталеин, 1% спиртовой раствор.

Фишера реактив (приготовление и установка титра).

1. Метанол. Применяют синтетический метанол. Для обезвоживания к 1 л метанола прибавляют 100—150 г безводной сернокислой меди и настаивают в тече-

ние 10—12 часов при периодическом помешивании. Если первая порция сернокислой меди голубеет, метанол сливают и настаивают на другой порции меди и т. д. Высушенный метанол перегоняют. Влажность его не должна превышать 0,1—0,2%.

2. Пиридин. К 1 л химически чистого пиридина добавляют около 50 г кристаллического KOH. Если щелочь расплавляется, добавляют свежую порцию ее. Высушенный пиридин перегоняют, собирая фракцию, отгоняющуюся при 114—115°. Влажность пиридина не должна превышать 0,1—0,2%.

3. Йод. Кристаллический йод очищают возгонкой и сушат в эксикаторе над $CaCl_2$.

Приготовление реактива В бунзеновскую колбу, соединенную с осушительной системой, состоящей из U-образной трубки, содержащей прокаленный $CaCl_2$, и промывной склянки с химически чистой H_2SO_4, помещают 67 г пиридина, 167 г метанола и 21 г йода. Через смесь пропускают ток SO_2, получаемый из прибора приливанием из капельной воронки серной кислоты к $KMnO_4$ и высушенный над $CaCl_2$ и затем H_2SO_4 Во все время пропускания SO_2 склянка со смесью должна охлаждаться ледяной водой. На указанное количество смеси должно быть израсходовано 16 г SO_2, что определяют привесом смеси на 16 г. Готовый реактив сохраняют защищенным от влаги, воздуха и света Попадание в реактив влаги делает его непригодным к употреблению.

Установка титра. Точную навеску в количестве около 1 г помещают в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят сухим метанолом до метки. Из полученного раствора отбирают несколько проб в количестве от 1 до 5 мл и титруют приготовленным реактивом Фишера из бюретки, снабженной хлоркальциевой трубкой, или, что лучше, включенной в замкнутую систему, до появления бурого окрашивания Параллельно титруют такое же количество сухого метанола.

Примечание Вся посуда, применяемая при работе с реактивом Фишера, должна быть совершенно сухой.

Титр реактива Фишера выражают в граммах H_2O на 1 мл и вычисляют по формуле:

$$k = \frac{a \cdot 100}{(v - v_1) \cdot m},$$

где a — навеска воды в г;
100 — постоянный коэффициент;
v — количество реактива Фишера, пошедшее на титрование воды, в мл;
v_1 — количество реактива Фишера, пошедшее на титрование метанола, в мл;
m — количество раствора воды, взятое на титрование, в мл.

Определение влажности применяемых реактивов (метанол, пиридин). 1 мл испытуемого раствора титруют реактивом Фишера до появления бурого окрашивания.

Расчет содержания влаги в процентах (x) ведут по формуле:

$$x = \frac{v \cdot \kappa \cdot 100}{m},$$

где v — количество реактива Фишера, пошедшее на титрование, в мл;
κ — титр реактива, выраженный в граммах H_2O на 1 мл;
100 — пересчет в %;
m — количество испытуемого раствора, взятое на титрование, в мл.

Формольная смесь (для определения глутаминовой кислоты). К 50 мл 40% раствора формалина добавляют 1 мл раствора фенолфталеина и 0,2 н. раствор щелочи до слабо-розовой окраски. Смесь должна быть свежеприготовленной.

Формольная смесь. К 50 мл продажного 30—40% формалина добавляют 25 мл абсолютного этилового спирта, 5 мл раствора тимолфталеина и 0,5 н. раствора NaOH до появления бледно-синеватой окраски.

Тимолфталеин для этого реактива готовят растворением 0,05 г тимолфталеина в 100 мл 95% этилового спирта. Применяется при формольном титровании.

Фосфатная буферная смесь с pH=7,0 11,876 г Na_2HPO_4 2 H_2O растворяют в 1 л дистиллированной воды — раствор I.

9,078 г KH_2PO_4 растворяют в 1 л дистиллированной воды — раствор II.

Смешивают 7 ч раствора I и 3 ч. раствора II; pH раствора около 7,0.

Хлорная кислота. 0,1 н. раствор для неводного титрования витаминов приготовляют следующим образом: 11,7 мл 57% или 18,1 мл 42% водного раствора хлорной кислоты помещают в мерную колбу емкостью 1 л, туда же добавляют 300 мл безводной уксусной кислоты. Колбу помещают в холодную воду и постепенно прибавляют при помешивании 140 мл уксусного ангидрида, избегая сильного разогревания. По охлаждении раствор доводят до метки уксусной кислотой. Для установки титра раствора поступают следующим образом: 0,53 г карбоната натрия (точная навеска) переносят в мерную колбу емкостью 100 мл при помощи безводной уксусной кислоты и после полного растворения навески объем раствора доводят той же кислотой до метки. 5 мл полученного раствора разбавляют 10—15 мл безводной уксусной кислоты и титруют из бюретки приготовленным раствором хлорной кислоты в присутствии 1—2 капель раствора кристаллического фиолетового до перехода окраски из фиолетовой в голубовато-зеленую. 1 мл 0,1 н. раствора $HClO_4$ содержит 0,01005 г хлористой кислоты.

Хлороформ химически чистый, не содержащий примесей. Хлороформ отмывают 3—4 раза дистиллированной водой, отделяют от воды, высушивают свежепрокаленным сернокислым натрием или хлористым кальцием в течение суток и отгоняют на водяной бане при температуре 61°. Хранится в склянках темного стекла с притертой пробкой не более 1 месяца.

Церий-аммоний нитрат (0,1 н. раствор). Навеску 5,48 г $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$ растворяют в 100 мл 96% спирта.

Цинк сернокислый (0,1 М раствор). 28,755 г перекристаллизованного химически чистого сернокислого цинка растворяют в воде в мерной колбе емкостью 1 л и доводят водой до метки.

Эриохром черный. 0,1 г индикатора растворяют в 5 мл 25% раствора аммиака и затем добавляют 20 мл этилового спирта.

Этилат натрия (0,1 н. раствор). В 1 л абсолютного этилового спирта постепенно, небольшими кусочками, вносят при перемешивании металлический натрий в количестве 2,3 г. После полного растворения и прекращения реакции раствор тщательно перемешивают. Титр его устанавливают по 0,1 н раствору HCl перед каждым определением по общим правилам анализа.

Этиловый спирт. Для освобождения спирта от альдегидов настаивают его в течение 10—12 часов над твердым NaOH (5—10 г на 1 л спирта) и перегоняют.

Этиловый спирт (для спектральных и полярографических целей). В колбу емкостью 750 мл прибора для разгонки спирта (на шлифах!—применение пробок не допускается) загружают 500 мл 96% этилового спирта-ректификата и нагревают на колбонагревателе. Первую фракцию (50 мл) и конечную фракцию (50 мл) отбрасывают. Полученный спирт сохраняют в склянке темного стекла с притертой пробкой.

Этиловый спирт абсолютированный. 96% этиловый спирт кипятят в колбе с окисью кальция на водяной бане с обратным холодильником в течение 4—6 часов и отгоняют в изолированный от влаги приемник при помощи хлоркальциевой трубки, соединенный с форштоссом холодильника Либиха. Полученный отгон настаивают с прокаленной сернокислой медью и отгоняют безводный спирт, как указано выше. Реактив сохраняют в склянке с притертой пробкой.

Эфир петролейный. Температура кипения 35—40°.

Эфир этиловый (серный). В склянку с корковой пробкой помещают 500 мл эфира, 50 мл 4% раствора $KMnO_4$, 5 мл 40% раствора NaOH или KOH, взбалтывают и оставляют на сутки в темноте. Смесь переносят в делительную воронку, нижний слой сливают, а эфир промывают 5—6 раз дистиллированной водой (в отношении 2:1), высушивают в течение суток сернокислым натрием, перегоняют и сохраняют в темноте.

Примечание Эфир необходимо проверять на отсутствие перекисей по качественной реакцни с йодистым калнем

Приложение 1

Таблица перевода показаний гальванометра фотоколориметра Д в экстинкцию Е (L=2—lg Д)

Д	Е	Д	Е	Д	Е	Д	Е
100	0,000	78	0,108	56	0,252	34	0,462
99,5	0,002	77,5	0,111	55,5	0,256	33,5	0,475
99	0,004	77	0,114	55	0,260	33	0,482
98,5	0,007	76,5	0,116	54,5	0,264	32,5	0,488
98	0,009	76	0,119	54	0,268	32	0,495
97,5	0,011	75,5	0,122	53,5	0,272	31,5	0,502
97	0,013	75	0,125	53	0,276	31	0,509
96,5	0,016	74,5	0,128	52,5	0,280	30,5	0,516
96	0,018	74	0,131	52	0,284	30	0,523
95,5	0,020	73,5	0,134	51,5	0,288	29,5	0,530
95	0,022	73	0,137	51	0,292	29	0,538
94,5	0,025	72,5	0,140	50,5	0,297	28,5	0,545
94	0,027	72	0,143	50	0,301	28	0,553
93,5	0,029	71,5	0,146	49,5	0,305	27,5	0,561
93	0,032	71	0,149	49	0,310	27	0,569
92,5	0,034	70,5	0,152	48,5	0,314	26,5	0,577
92	0,036	70	0,155	48	0,319	26	0,585
91,5	0,039	69,5	0,158	47,5	0,323	25,5	0,594
91	0,041	69	0,161	47	0,328	25	0,602
90,5	0,043	68,5	0,163	46,5	0,332	24,5	0,611
90	0,046	68	0,168	46	0,337	24	0,620
89,5	0,048	67,5	0,171	45,5	0,342	23,5	0,629
89	0,051	67	0,174	45	0,347	23	0,638
88,5	0,053	66,5	0,177	44,5	0,352	22,5	0,648
88	0,056	66	0,181	44	0,357	22	0,658
87,5	0,058	65,5	0,184	43,5	0,362	21,5	0,668
87	0,061	65	0,187	43	0,367	21	0,678
86,5	0,063	64,5	0,191	42,5	0,372	20,5	0,688
86	0,066	64	0,194	42	0,377	20	0,699
85,5	0,068	63,5	0,197	41,5	0,382	19,5	0,710
85	0,071	63	0,201	41	0,387	19	0,721
84,5	0,073	62,5	0,204	40,5	0,392	18,5	0,733
84	0,076	62	0,208	40	0,398	18	0,745
83,5	0,078	61,5	0,211	39,5	0,403	17,5	0,757
83	0,081	61	0,215	39	0,409	17	0,770
82,5	0,084	60,5	0,218	38,5	0,414	16,5	0,782
82	0,086	60	0,222	38	0,420	16	0,796
81,5	0,089	59,5	0,226	37,5	0,426	15,5	0,810
81	0,092	59	0,229	37	0,432	15	0,824
80,5	0,094	58,5	0,233	36,5	0,438	14,5	0,838
80	0,097	58	0,237	36	0,444	14	0,854
79,5	0,100	57,5	0,240	35,5	0,450	13,5	0,870
79	0,102	57	0,244	35	0,456	13	0,886
78,5	0,105	56,5	0,248	34,5	0,402	12,5	0,908

Продолжение

Д	Е	Д	Е	Д	Е	Д	Е
12	0,921	9	1,046	6	1,222	3	1,523
11,5	0,939	8,5	1,071	5,5	1,260	2,5	1,602
11	0,959	8	1,097	5	1,301	2	1,699
10,5	0,979	7,5	1,126	4,5	1,347	1,5	1,824
10	1,000	7	1,155	4	1,398	1	2,000
9,5	1,022	6,5	1,187	3,5	1,456		

Приложение 2

Таблица для определения сорбозы в миллиграммах (по Бертрану), 0,1 н. раствор $KMnO_4$

Раствор $KMnO_4$ в мл	Сорбоза в мг	Раствор $KMnO_4$ в мл	Сорбоза в мг	Раствор $KMnO_4$ в мл	Сорбоза в мг	Раствор $KMnO_4$ в мл	Сорбоза в мг	Раствор $KMnO_4$ в мл	Сорбоза в мг
1,54	10,0	5,24	35,0	8,84	60,0	12,27	85,0	15,61	110,0
1,69	11,0	5,41	36,0	8,98	61,0	12,40	86,0	15,74	111,0
1,84	12,0	5,55	37,0	9,12	62,0	12,54	87,0	15,87	112,0
1,99	13,0	5,70	38,0	9,25	63,0	12,67	88,0	16,0	113,0
2,14	14,0	5,84	39,0	9,39	64,0	12,81	89,0	16,14	114,0
2,30	15,0	5,99	40,0	9,53	65,0	12,94	90,0	16,27	115,0
2,45	16,0	6,13	41,0	9,67	66,0	13,07	91,0	16,40	116,0
2,60	17,0	6,28	42,0	9,81	67,0	13,21	92,0	16,53	117,0
2,75	18,0	6,42	43,0	9,94	68,0	13,34	93,0	16,67	118,0
2,90	19,0	6,56	44,0	10,08	69,0	13,48	94,0	16,79	119,0
3,05	20,0	6,70	45,0	10,23	70,0	13,61	95,0	16,93	120,0
3,20	21,0	6,85	46,0	10,37	71,0	13,74	96,0	17,06	121,0
3,35	22,0	6,99	47,0	10,50	72,0	13,88	97,0	17,19	122,0
3,49	23,0	7,13	48,0	10,64	73,0	14,01	98,0	17,32	123,0
3,64	24,0	7,28	49,0	10,77	74,0	14,15	99,0	17,45	124,0
3,79	25,0	7,42	50,0	10,91	75,0	14,28	100,0	17,58	125,0
3,94	26,0	7,56	51,0	11,05	76,0	14,41	101,0	17,72	126,0
4,09	27,0	7,70	52,0	11,18	77,0	14,55	102,0	17,85	127,0
4,23	28,0	7,85	53,0	11,32	78,0	14,68	103,0	17,98	128,0
4,38	29,0	7,99	54,0	11,45	79,0	14,81	104,0	18,11	129,0
4,53	30,0	8,13	55,0	11,59	80,0	14,95	105,0	18,24	130,0
4,68	31,0	8,27	56,0	11,72	81,0	15,08	106,0	18,37	131,0
4,82	32,0	8,41	57,0	11,86	82,0	15,21	107,0	18,50	132,0
4,97	33,0	8,55	58,0	12,0	83,0	15,34	108,0	18,63	133,0
5,11	34,0	8,70	59,0	12,13	84,0	15,48	109,0	18,76	134,0

Определение сухих веществ в растворе сорбита по показаниям рефрактометра

(до 4% содержание сухих веществ в процентах и в граммах на 100 мл раствора соответствует показанию сахарной шкалы рефрактометра)

Показания сахарной шкалы	Содержание сорбита		Показания сахарной шкалы	Содержание сорбита		Показания сахарной шкалы	Содержание сорбита		Показания сахарной шкалы	Содержание сорбита	
	%	г на 100 мл		%	г на 100 мл		%	г на 100 мл		%	г на 100 мл
4,0	4,0	4,1	11,8	11,8	12,3	19,4	19,4	20,8	27,0	27,1	29,9
4,2	4,2	4,3	12,0	12,0	12,5	19,6	19,6	21,1	27,2	27,3	30,1
4,4	4,4	4,5	12,2	12,2	12,7	19,8	19,9	21,3	27,4	27,5	30,4
4,6	4,6	4,7	12,4	12,4	13,0	20,0	20,1	21,6	27,6	27,7	30,6
4,8	4,8	4,9	12,6	12,6	13,2	20,2	20,3	21,8	27,8	27,9	30,8
5,0	5,0	5,1	12,8	12,8	13,4	20,4	20,5	22,0	28,0	28,1	31,1
5,2	5,2	5,3	13,0	13,0	13,6	20,6	20,7	22,3	28,2	28,3	31,3
5,4	5,4	5,5	13,2	13,2	13,8	20,8	20,9	22,5	28,4	28,5	31,6
5,6	5,6	5,7	13,4	13,4	14,1	21,0	21,1	22,7	28,6	28,7	31,8
5,8	5,8	5,9	13,6	13,6	14,3	21,2	21,3	23,0	28,8	28,9	32,1
6,0	6,0	6,1	13,8	13,8	14,5	21,4	21,5	23,2	29,0	29,1	32,2
6,2	6,2	6,3	14,0	14,0	14,7	21,6	21,7	23,4	29,2	29,3	32,6
6,4	6,4	6,5	14,2	14,2	14,9	21,8	21,9	23,7	29,4	29,5	32,8
6,6	6,6	6,7	14,4	14,4	15,2	22,0	22,1	23,9	29,6	29,7	33,1
6,8	6,8	7,0	14,6	14,6	15,4	22,2	22,3	24,2	29,8	30,0	33,4
7,0	7,0	7,2	14,8	14,8	15,6	22,4	22,5	24,4	30,0	30,2	33,7
7,2	7,2	7,4	15,0	15,0	15,8	22,6	22,7	24,6	30,2	30,4	33,9
7,6	7,6	7,8	15,2	15,2	16,0	22,8	22,9	24,8	30,4	30,6	34,1
7,8	7,8	8,0	15,4	15,4	16,3	23,0	23,1	25,1	30,6	30,8	34,4
8,0	8,0	8,2	15,6	15,6	16,5	23,2	23,3	25,3	30,8	31,0	34,6
8,2	8,2	8,4	15,8	15,8	16,7	23,4	23,5	25,6	31,0	31,2	34,9
8,4	8,4	8,6	16,0	16,0	16,9	23,6	23,7	25,8	31,2	31,4	35,2
8,6	8,6	8,8	16,2	16,2	17,1	23,8	23,9	26,0	31,4	31,6	35,4
8,8	8,8	9,1	16,4	16,4	17,4	24,0	24,1	26,3	31,6	31,8	35,7
9,0	9,0	9,3	16,6	16,6	17,6	24,2	24,3	26,5	31,8	32,0	35,9
9,2	9,2	9,5	16,8	16,8	17,8	24,4	24,5	26,7	32,0	32,2	36,2
9,4	9,4	9,7	17,0	17,0	18,1	24,6	24,7	27,0	32,2	32,4	36,5
9,6	9,6	9,9	17,2	17,2	18,3	24,8	24,9	27,2	32,4	32,6	36,7
9,8	9,8	10,1	17,4	17,4	18,5	25,0	25,1	27,6	32,6	32,8	37,0
10,0	10,0	10,4	17,6	17,6	18,7	25,2	25,3	27,7	32,8	33,0	37,2
10,2	10,2	10,6	17,8	17,8	19,0	25,4	25,5	27,9	33,0	33,2	37,5
10,4	10,4	10,8	18,0	18,0	19,2	25,6	25,7	28,2	33,2	33,4	37,7
10,6	10,6	11,0	18,2	18,2	19,4	25,8	25,9	28,4	33,4	33,6	38,0
10,8	10,8	11,2	18,4	18,4	19,6	26,0	26,1	28,7	33,6	33,8	38,3
11,0	11,0	11,4	18,6	18,6	19,9	26,2	26,3	28,9	33,8	34,0	38,5
11,2	11,2	11,6	18,8	18,8	20,1	26,4	26,5	29,2	34,0	34,2	38,8
11,4	11,4	11,9	19,0	19,0	20,3	26,6	26,7	29,4	34,2	34,4	39,0
11,6	11,6	12,1	19,2	19,2	20,6	26,8	26,9	29,6	34,4	34,6	39,3

Показания сахарной шкалы	Содержание сорбита		Показания сахарной шкалы	Содержание сорбита		Показания сахарной шкалы	Содержание сорбита		Показания сахарной шкалы	Содержание сорбита	
	%	г на 100 мл		%	г на 100 мл		%	г на 100 мл		%	г на 100 мл
34,6	34,8	39,5	40,0	40,6	47,1	45,4	46,4	54,9	50,8	52,2	63,2
34,8	35,0	39,8	40,2	40,8	47,3	45,6	46,6	55,2	51,0	52,4	63,5
35,0	35,2	40,1	40,4	41,0	47,6	45,8	46,9	55,6	51,2	52,6	63,8
35,2	35,4	40,3	40,6	41,2	47,9	46,0	47,1	55,9	51,4	52,8	64,0
35,4	35,6	40,5	40,8	41,5	48,3	46,2	47,3	56,2	51,6	53,0	64,3
35,6	35,8	40,8	41,0	41,7	48,5	46,4	47,5	56,5	51,8	53,3	64,6
35,8	36,1	41,2	41,2	41,9	49,8	46,6	47,7	56,8	52,0	53,5	64,9
36,0	36,3	41,5	41,4	42,1	49,0	46,8	47,9	57,0	52,2	53,7	65,2
36,2	36,5	41,7	41,6	42,3	49,3	47,0	48,1	57,3	52,4	53,9	65,5
36,4	36,7	42,0	41,8	42,5	49,6	47,2	48,2	57,6	52,6	54,1	65,9
36,6	36,9	42,2	42,0	42,7	49,9	47,4	48,5	57,9	52,8	54,4	66,3
36,8	37,2	42,6	42,2	42,9	50,2	47,6	48,7	58,2	53,0	54,6	66,7
37,0	37,4	42,9	42,4	43,1	50,4	47,8	49,0	58,6	53,2	54,8	66,0
37,2	37,6	43,1	42,6	43,3	50,7	48,0	49,2	58,9	53,4	55,0	67,3
37,4	37,8	43,4	42,8	43,5	50,7	48,2	49,4	59,2	53,6	55,2	67,6
37,6	37,8	43,4	43,0	43,8	51,4	48,4	49,6	59,5	53,8	55,5	68,0
37,8	38,2	43,9	43,2	44,0	51,7	48,6	49,8	59,8	54,0	55,7	68,3
38,0	38,4	44,2	43,4	44,2	51,9	48,8	50,1	60,2	54,2	55,9	68,6
38,2	38,6	44,5	43,6	44,4	52,2	49,0	50,3	60,5	54,4	56,1	68,9
38,4	38,8	44,7	43,8	44,7	52,6	49,2	50,5	60,7	54,6	56,3	69,2
38,6	39,0	45,0	44,0	44,9	52,8	49,4	50,7	61,0	54,8	56,5	69,5
38,8	39,3	45,4	44,2	45,1	53,1	49,6	50,9	61,3	55,0	56,7	69,8
39,0	39,5	45,6	44,4	45,3	53,4	49,8	51,2	61,7	55,2	56,9	70,1
39,2	39,7	45,9	44,6	45,5	53,7	50,0	51,4	62,0	55,4	57,1	70,4
39,4	39,9	46,2	44,8	45,8	54,1	50,2	51,6	62,3	55,6	57,3	70,7
39,6	40,1	46,4	45,0	46,0	54,4	50,4	51,8	62,6	55,8	57,6	71,1
39,8	40,4	46,8	45,2	46,2	54,7	50,6	52,0	62,9	56,0	57,8	71,4



Литература

Апельцвейг Н. Хроматография. Под ред. М. Дубнинина. М., 1949.

Асатиани Г. С. Биохимический анализ. Т. I, II. Грузмедгиз. Тбилиси, 1951.

Басаргин Н. Н. Карбоксиарсеиазо. Союзреактив. М., 1963.

Беэр А. А., Рубцов И. А. Синтез витаминов. Пищепромиздат, 1956.

Березовский В. М. Химия витаминов. Пищепромиздат. М., 1959.

Берль-Лунге Е. Химико-технологические методы исследования. Т. IV. Госхимиздат, 1941.

Бернгауэр К. Введение в технику лабораторных работ по органической химии. ОНТИ, 1935.

Блок Р., Лестранж Р., Цвейг Г. Хроматография на бумаге. М., 1954.

Вайсберг Л. Физические методы органической химии. М., 1955

Вейганд К. Методы эксперимента в органической химии. Т. IV М., 1955.

Вейгерт Ф. Оптические методы химии. ОНТИ, 1934.

Витамины. Сб. I, II, III. Изд. АН СССР, 1953—1958.

Витамины. Сб. 1, 2, 3, 4, 5. Пищепромиздат, 1956—1958.

Гаркина И. Н. Тезисы докладов и сообщений IV Всесоюзного совещания по витаминам. Изд. МГУ, 1957.

Гейровский Я. Техника полярографического исследования. М., 1951.

Гейровский Я. Полярография. ОНТИ, 1937.

Гиллебранд В. и Лендель Г. Практическое руководство по неорганическому анализу. ОНТИ, 1937.

Гиллем А., Штерн Е. Электронные спектры поглощения органических соединений И. Л., М., 1957.

Государственная фармакопея СССР. IX изд. Медгиз, 1961.

ГОСТ 7047-55. Витамины А, B_1, B_2, РР, С и D. Методы определения.

Губен-Вейль. Методы органической химии. II. Методы анализа. М., 1963.

Гусева А. Р., Нестюк М. Н. Биохимия, 1953, 18, 4.

Девятнин В. А. Витамины. Пищепромиздат, 1948.

Девятнин В. А. В сб.: Витамины за рубежом. 5. Пищепромиздат, 1958.

Девятнин В. А. и Иосикова В. М. Вопросы питания, 1935, 4.

Девятнин В. А. и Иосикова В. М. ДАН СССР, 3, 4, 1935.

Девятнин В. А., Кравчина Л. Н., Стольникова Н. М. Сб. трудов ВНИВИ. IV. Пищепромиздат, 1953.

Девятнин В. А., Федорова Г. А. Труды ВНИВИ, VII. Пищепромиздат, 1961.

Девятнин В. А., Федорова Г. А. Труды ВНИВИ, VIII, 1961; цит. по МРТУ—42 № 2892—62.

Девятнин В. А. и Федорова Г. А. Труды ВНИВИ. Т. 6, Пищепромиздат, 1958.

Демьянов Н. Я. и Прянишников Н. Д. Общие приемы анализа растительных веществ. Сельхозгиз, 1930.

Дихлорэтан. Под ред. Ю. Руденко. ГИОВ, 1939.

Залкинд Ю. С. Химия органических соединений с открытой цепью. Л. Гос. науч.-техн. издательство Центрохимсектор, 12 тип. ОГИЗ'а РСФСР, 1932.

Иванов Н. Н. Методы физиологии и биохимии растений. М.—Л., Сельхозгиз, 1946.

Иосикова В. М. Журнал «Лабораторная практика», 1939, 8.

Иосикова В. М. Журнал «Лабораторная практика», 1940, 1.

Иосикова В. М. Журнал «Аналитическая химия», 1955, 10, 3.

Иосикова В. М., Зворкина В. В., Чесалкина Е. Н. Сб. трудов ВНИВИ. IV. Пищепромиздат, 1953.

Иоу Д. Г. Колориметрия. Госхимиздат, 1935.

Каневский Е. Журнал прикладной химии, 17, 514—519, 1944.

Карякин Ю. В. Чистые химические реактивы. Госхимиздат, 1947.

Каррер П. Курс органической химии. ОНТИ, 1938.

Кизель А. Р Практическое руководство по биохимии растений. Биомедгиз, 1934.

Кларк Т. Руководство по качественному и количественному анализу. ОНТИ, 1934.

Кольтгоф И. М. Объемный анализ. Ч. I, 1930; ч. II, 1932.

Кольтгоф и Лингейн. Полярография. Госхимиздат, 1948.

Колтунова В. И. Труды ВНИВИ. VI. Пищепромиздат, 1958.

Конант Д. Курс органической химии. Госхимиздат, 1962.

Коршак В. В., Рафиков С. Р. Синтез и исследование высокомолекулярных соединений. Изд. АН СССР, 1949.

Коренман И. М. Количественный микрохимический анализ. М.—Л., Госхимиздат, 1949.

Кудряшов Б. А. Биологические основы учения о витаминах. Советская наука, 1948.

Кузнецов В. И., Михайлов В. А. Журнал аналитической химии, 1957, 12, 1.

Ластовский Р. П. Технический анализ в производстве промежуточных продуктов и красителей. Госхимиздат, 1949.

Лечебно-профилактические средства, предметы санитарии и гигиены, витаминные препараты. Сборник стандартов. Стандартгиз, 1957.
Лялнков Ю. С. Физико-химические методы анализа. Металлургиздат, 1948.
Мейер Г. Анализ и определение строения органических веществ. ОНТИ, 1935.
Методическое руководство по определению витаминов. Под ред. Б. А. Лаврова, Медгиз, 1960.
Методы определения витаминов (химические и биологические). Под ред. В. А. Девятнина. Пищепромиздат, 1954.
Михайленко Ю. А. Журнал «Успехи химии», 1947, 16, 443.
Мортон Э. А. Лабораторная техника в органической химии, 1941.
Обзор применяемых в Институте питания в Потсдаме-Ребрюкке методов определения витаминов. Потсдам-Ребрюкке, 1958.
Органические реакции. Сб. под ред. Адамса. М., 1948.
Оствальд Лютер. Физико-химические измерения. ОНТИ. Ч. I, 1933; ч. II, 1934.
Палладина О. К. Доклад на совещании по химии витаминов. Институт органической химии АН УССР. Киев, 1954.
Палаузов В. А. Химические реактивы. ОНТИ, 1935.
Пасхина Г. С. Журнал «Успехи биологической химии». Изд. АН СССР, 1950.
Преображенский Н. А., Генкин Э. Н. Химия органических лекарственных веществ. Госхимиздат, 1953.
Проскуряков Н. и Белозерский А. Практическое руководство по биохимии растений, 1950.
Рачинский В. В. Журнал «Успехи химии», 1950, 19, 4.
Рачинский В. В., Гапон Т. Б. Хроматография в биологии. Изд. АН СССР, 1953.
Реактивы и препараты лабораторного назначения. Под ред. В. В. Логинова. ГОНТИ, 1938.
Родионов В. М., Богословский В. М., Федорова А. М. Лабораторное руководство по химии промежуточных продуктов и красителей. ГХИ, 1948.
Руженцова А. К., Виноградова М. Е. Медицинская промышленность, 1950, 7, 8.
Савинов Б. Г. Каротин (провитамин А). Изд. АН УССР, 1948.
Самсонов Г. В. Хроматография. Медгиз, 1955.
Свешников Б. Я. Журнал прикладной химии, 1940, 13, 768.
Сеткина О. Н. Журнал «Оптико-механическая промышленность», 1940, 9.
Слободин Я. З., Зигель М., Янишевская М. Журнал прикладной химии, 1943, 16, 7—8, 280.
Словарь органических соединений. Пер. с англ. Под ред. В. М. Родионова, т. I, II, III. М., 1949.
Смирнов Б. С. Практические работы по органической химии. Сельхозгиз, 1935.
Сопін Е. Ф. Основи вчення про вітаміни. Рад. Шк., 1957.
Стиллер Э. Т. Физические методы определения витаминов. В сб.: Биохимия и физиология витаминов. В. 5. М., 1952.
Спутник химика. Т. II, III. Цит. по «Chem. Kalender». ОНТИ, 1935.
Тананаев Н. А. Объемный анализ. М., 1939.
Татьянин А. Р. Производство витамина D. М., Пищепромиздат, 1943.

Торп Д. и Уайтли М. Практическое руководство по органическому анализу. М., ОНТИ, 1937.
Труфанов А. В. Журнал «Вопросы питания», 1955, 14, 5, 3.
Труфанов А. В. Биохимия и физиология витаминов и антивитаминов. Сельхозгизиздат, 1959.
Толленс-Эльснер Ф. Краткий справочник по химии углеводов. ГОНТИ, 1938.
Файгль Ф. Капельный анализ. ОНТИ, 1937.
Фармацевтические препараты. Спр. Под ред. Б. Вотгал, И. Левинштейна и др. ОНТИ, 1934.
Федорова Г. А. В сб.: Витаминные ресурсы. Изд. АН СССР. М., 1959.
Фиалков Л. А. Методы исследования лекарственных веществ. Медгиз, 1946.
Цвет М. Хроматографический адсорбционный анализ. Изд. АН СССР, М., 1946.
Челинцев Г. и Беневоленская З. Журнал общей химии, 1944, 14, 1142.
Чичибабин А. Основные начала органической химии. Госиздат, 1961.
Чулановский В. М. Введение в молекулярный спектральный анализ. Государственное издательство технической литературы, 1951.
Шемякин Ф. М., Мицеловский Э. С., Романов Д. В. Хроматографический анализ. Госхимиздат, 1955.
Шерман О. С. Сборник трудов ВНИВИ. IV. Пищепромиздат, 1953.
Шорыгин П. П. Журнал «Успехи химии», 1944, 13, 90.
Шилов Н. А. Объемный анализ. М., 1932
Шкодин А. М. Журнал общей химии, 1940, 10, 1694.
Шленк В. и Бергман Э. Органическая химия. ОНТИ, 1936.
Шнайдман Л. О. Витаминная промышленность. Сб. 2. Пищепромиздат. М., 1956.
Шнайдман Л. О. Производство витаминов. Пищепромиздат, 1958.

Bandelin F., Tuschoff J. Anal. Chem., 1953, 8, 1198.
Beilstein B., Ber., 1872, 5, 620;
Bomskov H. Methodik der Vitaminforschung. L., 1936.
Borgstrom P., Hersch W. J. Am. Chem. soc, 1923, 45, 6, 1493.
Bruchmann E. Brauntweinwietschaft, 1951, 76, 184.
Bunyan J., Green J., Mamelis P., Macinkiewitz S. Nature, 1957, 179, 4556.
Chromatografia. Rea. J. Opienskij. Warzawa, 1957.
Chromatographie unter besonder Berückstigung der Papier Chromatographie. E. Merck, Darmstadt.
Dewalt C., Green R. Anal. chem., 1935, 1789
Gernoch M., Dokoupil J., Chutny B. Chem. Listy, 1953, 47, 2, 269, 271.
Hais J. M. u. Macek K. Handbuch der Papierchromatographie. Jena, 1958.
Hincel J., Ayling E., Walters T. J. chem. Soc., 1939, 403.
Hochberg M., Melnick D., Oser B. J. Biol. Chem., 1944, 155, 109.
Hörhammer R., Hansel A. Arch. pharm., 1955, 42, 7, 180—181.
Gaudiano A., Toffoli F., Baccacci M. Inst. de Sanitas. Roma.

Johnson B. Methods of vitamin determination, 1948.
Knobloch E. Physikalne-chemicke metodu stanovenja vitaminu. Praha, 1956.
Landinburg K., Tischer M., Wall J., Robson R. J. Amer. chem. Soc. 1944, 66, 1217.
Lorenz A., Arnold L. Food research, 1941, 6, 151—156.
McMahon J., Davis R., Kalnitsky G. Proc. Soc. exp. biol. a. med., 1950, 75, 799.
Methods of vitamin assay. Ass. vitam. chem., 1947.
Milrath H. Chem. Ztg., 1909, 33, 1249.
Morton R. Absorption spectra. London Hilger.
Morton R. The application of absorption spectra, 1942.
Nicloux M. Bull. Soc. chim., 1906, 35, 330.
Messinger H. B. 21, 3386, 1888; B. 59, 695, 1946.
Pace E. Les vitamines. Roma, 1949.
Pifer C., Wollish E. Anal. Chem., 1952, 24, 519.
Ogawa S. Vitamins, 1953, 6, 2, 241—246.
Reichstein T., Grüssuer A. Helv. chim. Acta, 1934, 17, 311.
Roe J. H., Oesterling M. J. J. Biol. chem., 1944, 152, 511.
Romjn Z. Anal. Chem., 1897, 36, 19.
Rubin S. H., De Ritter E., Schuman R. L., Bauernfield. Method of vitamin assay. Chim. anal. ed., 1945, 17, 136.
Sbornik vedeckych praci potravinarskeho prumyslu, 1955.
Schöniger W. Microchim. Acta, 1955, 1, 123—129.
Scudi J. J. Biol. chem., 1941, 139, 707.
Scudi J., Buhs R. J. Biol. chem., 1942, 1, 146.
Schwartz M., Williams J. N. Proc. soc. exp. biol. a. med., 1955, 88, 1, 136—138.
Siliprandi D., Siliprandi N. Biochim. biophys. Acta, 1954, 14, 52.
Szalkowsky C. R., Davidson J. H. Anal. chem., 1958, 258, 192.
Snell F.. Snell C. Colorimetric methods of analysis v. II, Organic and biological, 1937.
Stern M., Baxter J. Anal. chem., 1947, 19, 902.
Tannenbaum M., Clark E. Anal. Chem., 1951.
Tschapke H., Plessing H. Naturwiss., 1955, 14, 417.
Tschapke H., Plessing H. Naturwissenschaften, 1955, 42, 417. Nahrungs, 1958, 2, 444.
Tschapke H., Plessing H. Pharmazie, 1957, 12, 5, 262—264.
Valeur C. C. R. Soc. biol., 1899, 129, 552.
Vielel V. Determination of functionally organic compounds. Anal. Chem., 4, 665, 1951.
Vogel H. Chemie und Technik des Vitamines, 1951.
Vigues R. K., Chervet P. C. R., 1951, 232, 1412—21.
Wagner A., Burger A., Elze F. Die Aldehyde, 1931.
Wollish E. G., Schmall M. Anal. chem., 1950, 22, 8, 1038.
Wilson C., Weaterby L. Ind. Eng. Chem., 1942, 14, 5, 425.
Zechmeister L. Carotinoide. Berlin, 1934.

Содержание

Часть третья

ПРИГОТОВЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ РЕАКТИВОВ